ARICLÉCIO CUNHA DE OLIVEIRA

O TRATAMENTO COM MELATONINA, ASSOCIADO OU NÃO À PIOGLITAZONA, MELHORA A RESPOSTA METABÓLICA DO TECIDO ADIPOSO EM RATOS DIABÉTICOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

ARICLÉCIO CUNHA DE OLIVEIRA

O TRATAMENTO COM MELATONINA, ASSOCIADO OU NÃO À PIOGLITAZONA, MELHORA A RESPOSTA METABÓLICA DO TECIDO ADIPOSO EM RATOS DIABÉTICOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima

Versão corrigida. A versão original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Ariclécio Cunha de.
O tratamento com melatonina, associado ou não à Pioglitazona, melhora a resposta metabológica do tecido adiposo em ratos diabéticos / Ariclécio Cunha de Oliveira. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Bessa Lima.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Fisiologia do tecido adiposo branco.

Versão do título para o inglês: Melatonin treatment and its association with pioglitazone improves metabolic response in subcutaneous, periepidymal and retroperitoneal adipose tissue in diabetic rats.

1. Diabetes mellitus 2. Tecido adiposo 3. Melatonina 4. Insulina I. Lima, Prof. Dr. Fábio Bessa II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB057/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ariclécio Cunha de Oliveira.

Título da Tese: O tratamento com melatonina, associado ou não à Pioglitazona, melhora a resposta metabólica do tecido adiposo em ratos diabéticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Fábio Bessa Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **12** nas fls. **66** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Fabio Bessa Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Papel da melatonina e da sua associação com a pioglitazona na melhora da resposta metabólica do tecido adiposo em ratos diabéticos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Ariclécio Cunha de Oliveira, Amanda Baron Campaña, André Ricardo Gomes de Proença, Maria Isabel Cardoso Alonso Vale, Natalie Carolina de Castro, Rogério Antonio Laurato Sertié, Talita da Silva Mendes de Farias,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **20.02.09,** com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2009.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa.Dra.PATRÍCIA GAMA
Secretária-Suplente
CEEA – ICB/USP

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”
Albert Einstein

Dedico este trabalho a todos os meus familiares e amigos, especialmente a meus pais Evangelista e Ana Célia, a minha esposa Danielle e aos meus filhos Ariel e Davi.

Agradecimento especial

Ao professor Fábio Bessa Lima pelo apoio e pela confiança em meu trabalho e em minhas ideias. Obrigado pela dedicação e pela orientação!

Agradecimentos

À Deus, por tudo que tenho.

À minha família: meus pais João Evangelista e Ana Célia e minha esposa e filhos Danielle Oliveira, Ariel Oliveira e Davi Oliveira, que sempre me deram força e apoio nas minhas decisões compreendendo minhas ausências.

Aos animais que, involuntariamente, cederam a vida contribuindo para o conhecimento científico.

Ao professor Fabio Bessa Lima, pelo excelente trabalho de orientação.

Aos meus grandes amigos do laboratório, Leonardo Torres Leal, Arnaldo Henrique, André Ricardo, Amanda Baron, Talita Farias, Patrícia Chimin, Andressa Lopes, Natalie de Castro e Rogério Sertié, pois sem eles a execução deste trabalho seria tortuosa e ao lado dos quais passei grandes momentos não só de trabalho, mas também de diversões e amenidades; e em especial a Sandra Andreotti, pelo constante apoio técnico e força nos momentos de correria.

Aos professores José Cipolla Neto e Ângelo Raphael Carpinelli, pela colaboração.

À Marlene Rocha, pelo auxílio técnico.

À coordenação, secretaria e biblioteca da pós-graduação do programa de Fisiologia Humana do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Aos colegas, professores e funcionários e alunos do departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual do Ceará, por ter concedido o meu afastamento para cursar o doutorado.

À Andrelina Noronha Coelho de Souza, minha mãe acadêmica, por sempre ter confiado e apostado em mim e sempre ter me apoiado na vida acadêmica.

A todos os amigos e familiares que acolheram a mim e à minha família na cidade de São Paulo, Renata Falanga, Ronan, Vera Falanga, Aldo Falanga, Marcos, Maura, Jovacy, Livia, Miriam, Isabel, João Luiz, Andrea Zago, Felipe Almeida e Renato.

.

RESUMO

Oliveira AC. O tratamento com melatonina, associado ou não à pioglitazona, melhora a resposta metabólica do tecido adiposo em ratos diabéticos. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Diabetes mellitus é uma doença resultante da baixa sensibilidade à insulina ou insuficiência da célula beta pancreática ou da associação dos dois fatores. Ratos com diabetes induzida por estreptozotocina durante o período neonatal no quinto dia de idade desenvolvem o quadro diabético clássico de hiperglicemia, hipoinsulinemia, poliúria, polidipsia agravada pela resistência à insulina na vida adulta. Neste estudo, foi investigado se o efeito de longo prazo do tratamento com melatonina e a sua associação com a pioglitazona pode melhorar a resistência à insulina e outras desordens metabólicas nesses animais. Após o desmame, os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo controle (C) - animais saudáveis controle; grupo diabético (D) - animais diabéticos sem tratamento adicional; grupo melatonina (M) - ratos diabéticos tratados com melatonina (1mg/kg); grupo melatonina mais pioglitazona (MP) - ratos diabéticos tratados com melatonina (1mg/kg) e pioglitazona (5mg/kg). Quando adultos (12ª semana de idade) animais foram sacrificados e os tecidos adiposos subcutâneos (SC), epididimal (EP) e retroperitoneal (RP) foram retirados, pesados e processados para isolamento dos adipócitos para avaliar a taxa de captação de glicose, oxidação de glicose e incorporação em lipídios. Amostras de sangue foram coletadas para dosagens bioquímicas. Tratamento com melatonina, associada ou não com pioglitazona, reduziu a hiperglicemia, polidipsia e polifagia, assim como a resistência à insulina, como demonstrado por KITT e HOMA. No entanto, o tratamento com melatonina não conseguiu recuperar a deficiência de peso corporal, da massa de gordura e tamanho dos adipócitos de animais diabéticos. Os níveis de adiponectina e frutosamina foram completamente recuperados pelo tratamento com melatonina, associada ou não com pioglitazona, enquanto nem o nível de insulina plasmática, nem a capacidade de secreção de insulina foram melhorados nos animais diabéticos tratados. Além disso, a melatonina causou um atraso significativo no desenvolvimento sexual deixando as estruturas sexuais menores do que as dos animais diabéticos não tratados. O tratamento com melatonina, associado ou não à pioglitazona, melhorou a responsividade dos adipócitos à insulina dos animais diabéticos, como mostrado no teste de captação de glicose (SC, PE e PR), nos testes de oxidação da glicose e incorporação de glicose em lípidos (PE e RP), um efeito que parece ser parcialmente relacionado com um aumento da expressão de substrato receptor de insulina 1 (IRS1), acetil-coenzima-A carboxilase (ACC) e ácido graxo sintase (FAS). Os animais do grupo D apresentaram menor capacidade basal lipolítica no tecido PE em relação ao grupo C, enquanto o tratamento com melatonina associada à pioglitazona foi capaz de restaurar essa capacidade. Finalmente, os animais tratados com melatonina mostraram expressão gênica aumentada de IR, C/EBPα e FAS, e o grupo MP mostraram expressão gênica aumentada de G6PDH e C/EBPα. Em conclusão, o tratamento com melatonina foi capaz de atenuar as anormalidades metabólicas neste modelo de diabetes, incluindo a resistência à insulina, e promoveu um controle glicêmico a longo prazo.

Palavras-chaves: Diabetes. Melatonina. Tecido Adiposo.

ABSTRACT

Oliveira, AC. Melatonin treatment and its association with pioglitazone improves metabolic response in subcutaneous, periepididymal and retroperitoneal adipose tissue in diabetic rats. [Thesis (PhD in Human Physiology)]. Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2012.

Diabetes mellitus is a disease resulting from low insulin sensibility or pancreatic beta-cell insufficiency or the association of the two factors. Rats with streptozotocin-induced diabetes during the neonatal period by the fifth day of age develop the classic diabetic picture of hyperglycemia, hypoinsulinemia, polyuria, polydipsia aggravated by insulin resistance in adulthood. In this study, we investigated whether the effect of long-term treatment with melatonin and its association with pioglitazone can improve insulin resistance and other metabolic disorders in these animals. After weaning, the animals were divided into the following groups: control group (C) – healthy control animals, diabetic group (D) - diabetic animals without additional treatment, melatonin group (M) - diabetic rats treated with melatonin (1mg/kg); melatonin plus pioglitazone group (MP) - diabetic rats treated with melatonin (1mg/kg) and pioglitazone (5mg/kg). When adults (12th week of age) animals were then sacrificed and the subcutaneous (SC), epididymal (EP) and retroperitoneal (RP) fat pads were excised, weighed and processed for adipocyte isolation for assessing glucose uptake, oxidation and incorporation into lipids. Blood samples were collected for biochemical assays. Melatonin treatment, associated or not with pioglitazone, reduced hyperglycemia, polydipsia, and polyphagia as well as improved insulin resistance as demonstrated by K_{ITT} and $HOMA_{ir}$. However, melatonin treatment was unable to recover body weight deficiency, fat mass and adipocyte size of diabetic animals. Adiponectin and fructosamine levels were completely recovered by melatonin treatment, associated or not with pioglitazone, while neither plasma insulin level nor insulin secretion capacity were improved in diabetic animals. Furthermore, melatonin caused a marked delay in the sexual development leaving genital structures smaller than those of non-treated diabetic animals. Melatonin treatment, associated or not with pioglitazone, improved the adipocyte responsiveness to insulin in diabetic animals as shown in glucose uptake (SC, EP and RP), glucose oxidation and incorporation of glucose into lipids (EP and RP) tests, an effect that seemed to be partially related to an increased expression of insulin receptor substrate 1 (IRS1), acetyl-coenzyme-A carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS). Animals from group D showed a lower basal lipolytic capacity in tissue PE compared to group C, while treatment with melatonin associated with pioglitazone was able to restore this capability. Finally, animals treated with melatonin showed increased gene expression of IR, C/EBPα and FAS, and group MP showed increased gene expression of G6PDH and C/EBPα. In conclusion, melatonin treatment was capable of ameliorating the metabolic abnormalities in this particular diabetes model, including insulin resistance and promoting a better long-term glycemic control.

Keywords: Diabetes. Melatonin. Adipose Tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[^{3}H]-2DG - [^{3}H]-2 deoxiglicose

[^{3}H]-2DG-6-P – [^{3}H]-2-deoxifrutose-6-fosfato

5-HTP – 5-Hidroxitriptofano

AANAT – Arilalquilamina N-acetiltransferase

ACC – Acetil-CoA carboxilase

ACTG1 – Gama-Actina 1

ADA – Adenosina deaminase

ADD1/SREBP-1c – Proteína 1c ligadora do elemento responsivo a esterol

AdipoQ – Adiponectina

AGL – Ácido Graxo Livre

AgRP – Peptídio Agouti

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

AMPK – Quinase de proteína ativada pela 5'-adenosina monofosfato

aP2 – Proteína ligadora de ácido graxo

ATP – Adenosina trifosfato

AUC – Área sob a curva

B2M – microglobulina B2

Bs – Basal

BSA – Albumina de Soro Bovino

C/EBPα – CCAAT/*enhancer binding protein* α

C/EBPβ – CCAAT/*enhancer binding protein* β

CART – Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina

CV – Coeficiente de variação

DM – *Diabetes Mellitus*

DMEM – MeioDulbecco MEM

DMSO – Dimetilsulfóxido

DTT – Ditiotreitol

EDTA – Ácido Etilenodiamino tetraacético

EPM – Erro padrão da média

FAS – Ácido graxo sintase

FABP – Proteína de ligação de ácidos graxos

G6PHD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

G.T.T. – Teste de tolerância a glicose

GLUT4 – Transportador de glicose 4

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

HbA1c – Hemoglobina glicada

HDL – Lipoproteína de densidade alta

HEPES – Ácido hidroxietil piperazineethanesulfonico

HIONT – Hidroxi-indol-O-metiltransferase

HOMAir – *Homeostasis model assessment-estimated insulin resistance*

HPG – Hipotálamo-hipófise-gonadas

HPRT-1 – Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

HSL – Lipase hormônio sensível

IGF1 – Fator de crescimento semelhante à insulina 1

IMC – Índice de massa corporal

IP3 – Inositol trifosfato

IR – Receptor de insulina

IRS1 – Substrato do receptor de insulina – 1

ISO – Isoproterenol

ITTiv – Teste de tolerância à insulina intravenosa

K_{ITT} – Constante de decaimento da glicose plasmática

LPL – Lipase de liproteína

MGB – Minor groove binder

MT – Receptor para melatonina

Mx – Máximo

NAS – N-acetilserotonina

NSQ – Núcleo supraquiasmático

NPY – Neuropeptídio Y

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Periepididimal

PGM – Fosfo-glico-mutase

PI3K – Fosfatidil-inositol 3-quinase

PKC – Pretína quinase C

POMC – Pró-ópio-melanocortina

PPARγ - *Peroxissome proliferator-activated receptor* γ

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo (tempo real)

RP – Retroperitoneal

RPL 37-a – Proteína ribossomal l 37-a

RT – Transcrição reversa

RZR/ROR – Receptor Z para retinóide/receptor órfão para retinoide

SC – Subcutâneo

SDS – Sodio dodecil sulfato

SDS-PAGE – Sodio dodecil sulfato-Gel para eletroforese de poliacrilamida

SNC – Sistema nervoso central

STZ – Estreptozotocina

TAB – Tecido adiposo branco

TAG – Triacilglicerol

TEMED – Tetrametiletilenediamine

TNF-α - Fator de necrose tumoral

TPH1 – Triptofano hidroxilase 1

TZD – Tiazolidinediona

UI – Unidades internacionais

VRH – Via retino-hipotalâmica

YWHAZ – Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

1.1 MELATONINA E DIABETES MELLITUS 24
1.2 DIABETES EXPERIMENTAL, TECIDO ADIPOSO E MELATONINA 27

2 OBJETIVOS 30

2.1 OBJETIVOS GERAIS 30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

3 MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 ANIMAIS 31
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL 31
3.3 PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO CORPORAL E MATURAÇÃO SEXUAL 32
3.4 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (G.T.T. ORAL) 32
3.5 TESTE INTRAVENOSO DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITTIV) 33
3.6 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E EXTRAÇÃO DOS TECIDOS 33
3.7 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS E HORMONAIS 34
3.7.1 Determinação das concentrações séricas de glicose, frutosamina, triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AGL), colesterol total e HDL-colesterol 34
3.7.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE INSULINA, ADIPONECTINA, LEPTINA E TESTOSTERONA. 34
3.8 ISOLAMENTO DOS ADIPÓCITOS E ANÁLISE MORFOMÉTRICA 35
3.9 CÁLCULO INDIRETO DA CELULARIDADE 36
3.10 ISOLAMENTO DA ILHOTA PANCREÁTICA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SECRETORA DE INSULINA 36
3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS EM ADIPÓCITOS ISOLADOS 37
3.11.1 Teste de Captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([^{3}H]-2DG) em Adipócitos Isolados. 38
3.11.2 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Acetato em lipídeos e oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Acetato até $^{14}CO_2$ em adipócitos Isolados 39
3.11.3 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol 40
3.12 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOTTING* 40
3.12.1 Extração de proteínas 40
3.12.2 Preparo do gel de poliacrilamida 41
3.12.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e "Western blotting" 41
3.12.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose) 42
3.12.5 Sondagens das proteínas com anticorpos 42
3.12.6 Revelação com sistema Quimioluminescente 42
3.13 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVO – QPCR 43
3.13.1 Extração de RNA Total 43
3.12.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa 44
3.13.2 PCR quantitativo (real time) 45
3.13.3 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT) 45
3.13.4 Seleção de controles endógenos (housekeeping). 47
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA 47

4 RESULTADOS 48

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO NO PESO CORPORAL, GLICOSE PLASMÁTICA E OUTROS PARÂMETROS 48
4.2 TESTE ORAL DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT V.O.) 53
4.3 TESTE INTRAVENOSO DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT I.V.) 53
4.4 EFEITO DO TRATAMENTO NA MASSA ADIPOSA E A CELULARIDADE DOS COXINS SC, PE E RP. 53
4.5 EFEITO DO TRATAMENTO SOBRE O DESENVOLVIMENTO SEXUAL 61
4.6 EFEITO DO TRATAMENTO NOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ADIPONECTINA, INSULINA, GLICEMIA E OUTRAS DOSAGENS PLASMÁTICAS 61
4.7 SECREÇÃO ESTÁTICA DE INSULINA PELA ILHOTA PANCREÁTICA ISOLADA. 62
4.8 ENSAIOS BIOLÓGICOS 66

4.8.1 Teste de captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([3H]-2DG) em adipócitos isolados *66*
4.8.2 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Lipídeos e Oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$ em Adipócitos Isolados *68*
4.8.3 Teste de Incorporação de [2-^{14}C]-Acetato em Lipídeos e Oxidação [2-^{14}C]-Acetato até $^{14}CO_2$ em Adipócitos Isolados *72*
4.8.4 Teste de Avaliação da Atividade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol *75*
4.9 EXPRESSÃO DE PROTEÍNA POR WESTERN BLOTTING 77
4.10 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL (QPCR) NO TECIDO PERIEPIDIDIMAL (PE) 80

5 DISCUSSÃO **83**

6 CONCLUSÕES **93**

REFERÊNCIAS **94**

ANEXOS **114**

ANEXO A **115**

ARTIGOS DE PERÍODOS 115

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença complexa e de origem multifatorial associada à elevada taxa de mortalidade, morbidade e perda na qualidade de vida, em decorrência de suas complicações que afetam diversos órgãos e sistemas do organismo. Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstrou que 30 a 45% dos diabéticos apresentam retinopatia, 10 a 20% desenvolvem nefropatia, 20 a 35% desenvolvem neuropatia e 10 a 25% são portadores de doenças cardiovasculares, a principal causa de morte entre os diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 1997).

A incidência de Diabetes Mellitus vem aumentando dramaticamente nas últimas duas décadas, atingindo proporções epidêmicas em países industrializados e em desenvolvimento. Em 1985, 30 milhões de diabéticos foram diagnosticados no mundo todo. Em 10 anos, esse número aumentou para 135 milhões (representando cerca de 3% da população mundial) e projeções indicam que a incidência de diabetes irá aumentar em 42%, atingindo, assim, 300 milhões de pessoas em 2025 (Winer, Sowers, 2004). Desta forma, é considerada como uma doença com consequências devastadoras para a economia e, portanto, uma das principais ameaças para a saúde pública no século 21.

O diabetes está estreitamente relacionado com doenças micro e macrovasculares, sugerindo, assim, uma via fisiológica comum que envolve resistência à insulina e fatores de risco convencionais, como hipertensão e dislipidemias. De fato, a resistência periférica à ação da insulina está associada a um grupo de fatores de risco para doenças cardiovasculares, denominado de síndrome metabólica. As principais características dessa síndrome incluem: obesidade central (visceral), dislipidemias (caracterizadas pela hipertriacilglicerolemia, reduzidos níveis de HDL-colesterol e elevados níveis de LDLcolesterol), hiperglicemia e hipertensão arterial (Mcfarlane, 2001).

O padrão de distribuição da gordura corporal também apresenta forte correlação com o DM, onde a adiposidade visceral, mesmo na ausência de obesidade clínica, é considerada como um importante indicador da presença de resistência à insulina e hiperinsulinemia (Matsuzawa et al., 1992). Alguns trabalhos demonstraram que indivíduos que desenvolveram diabetes já apresentavam adiposidade visceral acima do normal e outros tiveram aumento dela

acompanhando o desenvolvimento da doença (Bergström et al., 1990; Chen et al., 1995; Fujimoto, 2000).

Embora exista essa forte correlação entre obesidade e resistência à insulina, outros trabalhos demonstraram que a falta de tecido adiposo também pode desencadear sérias complicações metabólicas. As lipodistrofias representam um grupo heterogêneo de desordens do tecido adiposo caracterizadas pela falta seletiva de gordura em várias partes do corpo (Foster, 1998). A ausência/perda de gordura pode variar desde depressões subcutâneas bem marcadas (lipodistrofias localizadas) até extensas e espalhadas, com ausência quase completa de gordura corporal (lipodistrofia generalizada). Este último tipo de lipodistrofia também tem seu quadro agravado pela presença de severa resistência à insulina, hipertriacilglicerolemia, DM em idade precoce e fígado gorduroso (esteatose hepática não alcoólica) decorrentes da ausência de tecido adiposo (Garg, 2011).

Na última década, um grande número de trabalhos vem demonstrando que o papel fisiológico do tecido adiposo não se restringe apenas ao balanço energético, isolamento térmico e proteção contra choques mecânicos, mas também um papel endócrino importante. A descoberta de que o tecido adiposo secreta diversos fatores e de suas relações diretas e indiretas em processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência à insulina e DM demonstram uma relação íntima entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares, assim como o papel endócrino do tecido adiposo modulando o comportamento funcional do próprio tecido e de outros, criando mecanismos de *feedback* entre eles (Hermsdorff,Monteiro, 2004).

A função secretora é uma importante característica do tecido adiposo. A identificação da leptina em 1994 (Zhang et al., 1994) levou ao reconhecimento geral do tecido adiposo como possuidor de uma importante função endócrina, sintetizando e secretando proteínas com atividades biológicas. Essas proteínas foram denominadas inicialmente de “adipocitocinas” em 1999 (Funahashi et al., 1999) e atualmente são conhecidas por adipocinas, secretadas não somente pelos adipócitos, mas também por outras células do estroma vascular (Funahashi et al., 1999; Frayn et al., 2003). Uma grande quantidade dessas proteínas foram e ainda são atualmente identificadas e suas origens atribuídas ao tecido adiposo. A função endócrina do tecido adiposo é bem ilustrada pela secreção de leptina e adiponectina, ambas possuindo um importante impacto no metabolismo energético.

A leptina é um hormônio com 16 kD secretado principalmente pelo tecido adiposo que regula crescimento, metabolismo e comportamento (Barb et al., 2001; Trayhurn, 2005). Possui ação sobre o hipotálamo, modulando o peso corporal, a ingestão de alimentos e o estoque de lipídios (Lord et al., 1998; Friedman, Halaas, 1998 Friedman, 2002). Existe uma correlação linear positiva (r = 0,8) entre os níveis plasmáticos de leptina e adiposidade corporal (Lonnqvist et al., 1997) e a secreção de leptina pode ser 7 vezes maior em indivíduos obesos quando comparados com indivíduos magros (Fried et al., 2000). Outros tecidos também expressam leptina, como a placenta (Hassink et al., 1997; Masuzaki et al., 1997), mucosa do fundo gástrico (Bado et al., 1998; Sobhani et al., 2000), músculo esquelético (Wang et al., 1998) e células do epitélio mamário (Smith-Kirwin et al., 1998).

A leptina possui ação em diversos tecidos periféricos via ligação com seu receptor Ob-R que é um membro da família do receptor para interleunina-6 da classe 1 dos receptores de citocinas (Tartaglia et al., 1995). A isoforma longa do receptor de leptina Ob-Rb ou ObR-L é encontrada no cérebro, mais especificamente em áreas que controlam a ingestão alimentar no hipotálamo (Tartaglia, 1997), mas também é encontrada em vários tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo (Gallardo et al., 2005), placenta (Bodner et al. 1999), medula adrenal (Cao et al., 1997), fígado (Briscoe et al., 2001), célula beta pancreática (Emilsson et al., 1997), pulmão (Tsuchiya et al., 1999), células intestinais (Morton et al. 1998), células mononucleares sanguíneas (Sanchez-Margalet, Martin-Romero, 2001), condrócitos articulares (Figenschau et al., 2001), coração (McGaffin et al., 2008) e músculo esquelético (Guerra et al., 2007). Além da isoforma longa, o gene do Ob-R codifica mais 4 isoformas curtas (short spliced form) do receptor de leptina: Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd e Ob-Re que estão presentes em concentração relativamente baixa no hipotálamo, microvasos, plexo coroide do cérebro bem como em todos os tecidos periféricos (Tartaglia et al., 1995; Tartaglia, 1997; Chen et al., 1996; Lee et al., 1996).

No hipotálamo a leptina age informando o estado da reserva energética (Frederich et al., 1995) através da supressão da atividade *da AMP-activated protein kinase* (AMPK) no hipotálamo medial exercendo efeito anoréxico e de perda de peso (Minokoshi et al., 2004). Essa inibição da AMPK ativa a acetil coenzima-A carboxilase (ACC) no núcleo arqueado e paraventricular do hipotálamo (Gao et al.,

2007). Essa ativação da ACC leva a um aumento nos níveis de malonil-CoA, especialmente no núcleo arqueado, e um aumento nos níveis de Palmitoil-CoA, especialmente no núcleo paraventricular, o que promove uma redução nos peptídios orexigênicos neuropeptídio Y (NPY) e *Agouti-related protein* (AgRP), levando uma redução na ingestão de alimentos (Gao et al., 2007). Além disso, a infusão de leptina no hipotálamo mediobasal de ratos inibe a sintese de lipídios no tecido adiposo branco (TAB) (Buettner et al., 2008) e a injeção no terceiro ventrículo cerebral aumenta a expressão gênica de lípase hormônio sensível (HSL) no TAB (Tajima et al., 2005).

O efeito da leptina sobre o metabolismo não se limita ao hipotálamo, mas também a outros tecidos que expressam o receptor de leptina (Tartaglia et al., 1995). A leptina age diretamente no músculo esquelético aumentando a oxidação de ácidos graxos via ativação de AMPK (Muoio et al., 1997; Minokoshi et al., 2002). Além disso, foi descrito na literatura que altos níveis plasmáticos de leptina em obesos estão relacionados com resistência à insulina (Segal et al., 1996). Foi demonstrado também que a leptina diminui a sensibilidade à insulina em adipócitos isolados (Müller et al., 1997; Walder et al., 1997) e inibe a secreção de insulina pela célula beta pancreática (Kieffer et al., 1997). Além dos seus efeitos metabólicos, a leptina tem se destacado pelo seu papel importante na modulação do sistema imunológico (Schaffler et al., 2007; Schaffler et al., 2006; Batra et al., 2007).

Uma diminuição da sinalização ou da função do receptor de leptina promove aumento da ingestão de energia e diminui o gasto energético (Friedman et al., 1998) e a deficiência de leptina causa obesidade severa, hipogonadismo, hiperinsulinemia, hiperfagia e deficiência imunológica mediada por linfócitos T (Farooqi et al., 2002; Strobel et al., 1998), que pode ser tratada com a sua reposição hormonal (Paz-Filho et al. 2011). Níveis elevados de leptina em pacientes obesos não promovem supressão do apetite devido à resistência à leptina por um defeito na sinalização do seu receptor, bloqueio à jusante em circuitos neuronais e defeitos no transporte de leptina através da barreira hematoencefálica (Flier, 2004).

A adiponectina foi descoberta na década de 1990 por 4 grupos independentes, quando foi originalmente chamada de Acrp30 (Scherer et al., 1995), AdipoQ (Hu et al., 1996), apM1 (Maeda et al. 1996) e GBP28 (Nakano et al. 1996). Até pouco tempo atrás, acreditava-se que ela era secretada exclusivamente pelo tecido adiposo, porém já foi demonstrado que a adiponectina é produzida e

secretada por cardiomiócitos murinos e humanos (Pineiro et al. 2005), músculo esquelético de humanos (Punyadeera et al., 2005) e de camundongos (Krause et al., 2008), porém ela é predominantemente secretada pelo tecido adiposo, sendo a mais abundante das adipocinas.

A sua concentração plasmática é inversamente proporcional ao índice de massa corporal (IMC) e à adiposidade visceral (Bajaj, Ben-Yehuda, 2006; Arita et al., 1999), e pode ser encontrada na circulação na forma de multímeros: trimero de baixo peso molecular (LMW), hexâmero de peso molecular médio (MMW) e multímeros de alto peso molecular (HMW) (12 a 18 multímeros) (Pajvani et al. 2003). O multímero HMW parece ser a forma ativa, uma vez que a sua concentração plasmática está relacionada com sensibilidade à insulina (Lara-Castro et al., 2006) e falhas na multimerização em humanos estão relacionadas com diabetes mellitus do tipo 2 (Waki et al., 2003).

Foram descritos dois tipos de receptores para adiponectina, AdipoR1 e AdipoR2. O AdipoR1 é abundantemente expresso em músculo esquelético de ratos (Punyadeera et al., 2005), mas também o é em células endoteliais (Motoshima et al., 2004), em cardiomiócitos (Pineiro et al., 2005) e em células β pancreáticas (Kharroubi et al., 2003). O AdipoR2 é predominantemente expresso no fígado (Yamauchi et al., 2003), mas também em células endoteliais (Tan et al., 2004). As duas formas também estão presentes em macrófagos e monócitos de humanos (Chinetti et al., 2004) e recentemente foi demonstrado que ambos também são expressos no hipotálamo (no núcleo paraventricular), indicando que a adiponectina exerce papel específico no cérebro (Kos et al., 2007). A via de sinalização intracelular ativada depende do tipo de receptor, sendo predominante a fosforilação de AMPK para o AdipoR1, ao passo que o AdipoR2 está envolvido na ativação de peroxissome proliferator-activated receptor-alpha (PPARα) (Yamauchi et al., 2003; Lee et al., 2008; Yamauchi et al., 2007)

Diversos efeitos da adiponectina têm sido descritos na literatura científica, dentre eles: efeito anti-inflamatório (Yokota et al., 2003; Wolf et al., 2004; Wulster-Radcliffe et al., 2004; Neumeier et al., 2006; Ajuwon, Spurlock, 2005; Kobashi et al., 2005) e efeito sensibilizador de insulina (Weyer et al., 2001; Hotta et al., 2000; Spranger et al., 2003; Hara et al., 2006; Waki et al., 2003). Outros efeitos importantes já descritos incluem: redução da atividade do nervo simpático renal e da pressão arterial em ratos, podendo esta ação ser mediada pelo núcleo

supraquiasmático hipotalâmico (Tanida et al., 2007), efeito antiaterogênico (Fasshauer et al. 2004) (a hipoadiponectinemia está associada com um perfil lipídico que favorece a aterosclerose, Okada et al., 2006), atividade hepatoprotetora, prevenindo o desenvolvimento de esteatose induzida por álcool em camundongos ob/ob (Xu et al. 2003, Masaki et al. 2004). Níveis plasmáticos de adiponectina reduzidos foram observados em pacientes com hepatite crônica (Durante-Mangoni et al., 2006); possui ação no hipotálamo, estando envolvida no controle do comportamento alimentar e no gasto energético (Qi et al., 2004; Kubota et al., 2007; Hoyda et al., 2007). Além desses, outros efeito foram descritos: redução do risco de doença cardiovascular (Shibata et al. 2004, Liao et al. 2005); inibição da tumorigênese (Pischon et al., 2008; Brakenhielm et al., 2004; Korner et al., 2007; Wang et al., 2006); aumento da produção de IL-8 em condrócitos de humanos (Gómez et al., 2011). Dessa forma, é importante ressaltar que a adiponectina é uma opção terapêutica promissora para doenças relacionadas à obesidade (Brochu-Gaudreau et al., 2010).

O tecido adiposo de indivíduos obesos apresenta certa de 50% a mais de macrófagos quando comparados com indivíduos estróficos (Weisberg et al., 2003). Nesse sentido, pesquisadores destacam maior expressão de TNF-α em adipócitos hipertrofiados e na condição de diabetes tipo 2 (Hotamisligil et al, 1993). Além disso, o TNF-α compromete a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina-1 no músculo esquelético e no tecido adiposo, favorecendo ainda mais o quadro de resistência à insulina (Hotamisligil et al, 1994). Essas evidências suportam as funções do TNF-α como uma citocina pró-inflamatória que tem um papel fundamental na resistência à insulina relacionada à obesidade. As concentrações de TNF-α estão aumentadas no tecido adiposo e no plasma de indivíduos obesos, e uma redução do peso corporal nesses indivíduos está associada com uma diminuição de sua expressão (Kern et al, 1995; Ziccardi et al, 2002). Por outro lado, a supressão do TNF-α ou de seus receptores esta associada com melhores respostas na sensibilidade à insulina e tolerancia à glicose em roedores obesos (Uysal et al., 1997), mas não em todos os estudos (Schreyer et al., 1998).

Alguns estudos mostram clara relação entre altas concentrações de IL-6 e a presença de resistência à insulina ou à DM2 (Pickup et al., 1997; Pradhan et al., 2001; Fernandez-Real et al., 2001). Por outro lado, estudos mostram que altas

concentrações de IL-6 e aumento da massa adiposa não são fatores de riscos independentes para o desenvolvimento da resistência à insulina, por causa da quantitativa secreção de IL-6 a partir do TAB (Carey et al., 2004; Kopp et al., 2003; Corpeleijn et al., 2005). Um aspecto relevante a ser destacado refere-se à gordura visceral, que pode secretar altas quantidades de IL-6, sendo este efeito um forte preditor de diabetes quando comparado com a gordura corporal total (Ohlson et al., 1985; Sepulveda-Lavados et al., 1996).

1.1 Melatonina e Diabetes Mellitus

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é o principal produto de secreção da glândula pineal, sendo sua produção feita de maneira rítmica e inibida pela luz, ocorrendo, portanto, no ciclo escuro, e o tempo de duração de sua secreção é proporcional ao tempo de escuridão (Armstrong, 1989; Cipolla-Neto; Afeche, 1992; Cagnacci, 1996). A ritmicidade circadiana de sua síntese é dependente de uma via neural que se inicia por neurônios da retina, que, através de projeções diretas da via retino-hipotalâmica (VRH), enviam as informações de luminosidade ambiental para o núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ) (Speh et al., 1993). Os NSQs enviam projeções para os núcleos paraventriculares hipotalâmicos (NPV) que apresentam projeções diretas ou indiretas aos neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal da coluna intermédio-lateral (CIL), na região torácica, que, por sua vez, enviam seus axônios aos gânglios cervicais superiores (GCS), os quais, pelos ramos carotídeos internos e nervos coronários (NC), projetam-se até a pineal (Cipolla-Neto; Afeche, 1999). Durante o período escuro, o circuito neural acima descrito é acionado, promovendo a liberação de noradrenalina pelos terminais simpáticos que inervam a glândula pineal.

Uma vez liberada, a norepinefrina age estimulando simultaneamente os receptores α1 e β1 adrenérgicos nos pinealócitos, desencadeando uma cascata de sinalização que promove a ativação de uma enzima passo-limitante da síntese de melatonina, a arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) (Klein et al., 1971, 1992)

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da ação da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1), cuja atividade está aumentada em duas vezes no período escuro. O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase

gerando a serotonina, que é metabolizada durante o período escuro à N-acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Posteriormente a NAS é utilizada como substrato para a enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (HIONT), sendo o produto final a melatonina (Sugden, 1989; Klein et al., 1992; Simonneaux e Ribelayga, 2003).

Além da glândula pineal, outros tecidos ou células também possuem a capacidade de produzir melatonina, tais como, retina (Gern, Ralph, 1979), pâncreas e trato gastrointestinal (Bubenik, 2002; 2008), placenta humana (Lanoix et al., 2008), medula óssea de ratos (Tan et al., 1999), linfócitos humanos (Carrillo-Vico et al., 2004), macrófagos de ratos (Martins et al., 2004).

A melatonina exerce seus efeitos biológicos por interação com receptores de membrana e intracelulares. São conhecidos três subtipos de receptores de membrana para melatonina MT1, MT2 e MT3 (Dubocovich et al., 1999). A interação da melatonina com esses receptores de membrana desencadeia vias de sinalizações diferentes dependendo do tecido alvo. Por exemplo, em células β pancreáticas, a ligação com receptores MT1 leva à ativação de proteína G inibitória (Gi), resultando na redução da atividade da adenil-ciclase e queda da geração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e diminui a secreção de insulina (Peschke et al. 2000). No entanto, a ligação com receptores MT2 inibe a via da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que também inibe a secreção de insulina (Peschke, 2008; Stumpf et al., 2008). Em contrapartida, através de uma terceira via de sinalização que envolve proteína Gq, fosfolipase C e inositol trifosfato (IP3) e consequente mobilização dos estoques intracelulares de cálcio, leva a um aumento da liberação de insulina (Bach et al., 2005; Peschke, Bach, Muhlbauer, 2006).

Nosjean et al. (2000) demonstraram que os receptores MT3, isolados de hamsters sírios, são na verdade uma enzima quinona redutase 2 sensível à melatonina.

Alguns autores demonstraram a ligação de melatonina a receptores nucleares RZR/ROR (receptor Z para retinoide/receptor órfão para retinoide) em células mononucleares sanguíneas de humano (Garcia-Maurino et al., 1998; Lardone et al., 2006), em cérebro (Caballero et al., 2008) e órgãos periféricos de camundongos (Naji et al. 2004). Um dos efeitos mais estudados, que independem

de interação com receptores, é a ação antioxidante (Reiter et al., 2002; Zhang et al., 2004; Tan et al., 2007).

Devido ao seu efeito sobre a secreção pancreática de insulina e a sua capacidade antioxidante, diversos autores têm se interessado em estudar a correlação entre melatonina, diabetes e resistência à insulina em diversos modelos experimentais. Alguns desses estudos focalizam o efeito protetor da melatonina nas células β pancreáticas de roedores contra o dano induzido por estreptozotocina (STZ) e o subsequente desenvolvimento de diabetes tipo 1 (Montilla et al., 1998; Andersson, Sandler, 2001; Aksoy et al., 2003; Anwar, Meki, 2003; Yavuz et al., 2003). Entretanto, uma grande quantidade de trabalhos investigou o efeito protetor da melatonina contra o estresse oxidativo ocasionado pelo quadro de hiperglicemia característica dos modelos experimentais de diabetes (Montilla et al., 1998, Sharma, Briyal, Gupta, 2005; Kurcer et al., 2007; Baydas et al., 2004; Armagan et al. 2006; Sudnikovich et al., 2007), de tal forma que a terapia adjuvante com melatonina tem alguns benefícios no controle das complicações diabéticas, que incluem desordem neurodegenerativa (Sharma, Briyal, Gupta, 2005), nefropatias (Kurcer et al., 2007), peroxidação lipídica elevada em testículos (Armagan et al. 2006) e complicações vasculares (Reyes-Toso et al., 2002; Sudnikovich et al., 2007). Embora a maioria desses estudos com melatonina e diabetes experimental tenha tratado os animais com melatonina, não existe um consenso na literatura a respeito dos efeitos do diabetes sobre a produção e secreção de melatonina na condição de diabetes induzida por STZ.

Alguns trabalhos demonstram que a melatonina exerce um papel no ritmo circadiano da glicemia, no gasto energético, na regulação da massa corporal e sobre a secreção e ação periférica da insulina (Margraf, Lynch, 1993; Lima et al., 1994, 1998; La Fleur et al., 1999, 2001; Picinato et al., 2002).

Em ratos com 10 meses de idade (maduros), a administração noturna de melatonina impede o aumento da adiposidade e queda dos níveis de insulina e leptina característicos do envelhecimento, sem alterar a redução na secreção de testosterona, T3 e IGF1 plasmático (Rasmussen et al., 1999). Quando administrada por um período prolongado de 12 semanas, reduz o peso corporal e os níveis de insulina e leptina sem alterar a quantidade de alimento ingerido (Wolden-Hanson et al., 2000; Rasmussen et al., 2001).

1.2 Diabetes experimental, tecido adiposo e melatonina

Obesidade e resistência à insulina estão altamente relacionadas com distúrbios metabólicos. Tanto o excesso como a redução do tecido adiposo pode levar a severa resistência à insulina e diabetes (Seip, Trygstad, 1996). O tecido adiposo exerce um importante papel na homeostasia energética, secreção de hormônios e outras proteínas que afetam a sensibilidade à insulina, apetite, balanço energético e o metabolismo dos lipídios. Em alguns casos, a restauração da massa do tecido adiposo resulta em melhora da resistência à insulina (Gavrilova et al., 2000). Foi estabelecido que a excitação dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma do tipo gama (PPARγ), o ganho de peso ou perda de peso regulam a expressão de vários genes envolvidos no metabolismo dos ácidos graxos e na patogênese da resistência à insulina (Guo, Tabrizchi, 2006). As tiazolidinedionas são um grupo de drogas que têm como característica aumentar a sensibilidade à insulina. As três drogas pertencentes a este grupo (pioglitazona, rosiglitazona e troglitazona), potentes e altamente seletivas para o PPARγ, já foram utilizadas em larga escala na prática clínica no controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo 2 (DREAM, 2006). O PPARγ é um receptor nuclear que é altamente expressado no tecido adiposo e é um ativador dominante da diferenciação de adipócitos (Brun et al., 1997). Um recente trabalho realizado por Takada e colaboradores, 2008 demonstrou que o tratamento com insulina e pioglitazona reduziu a hiperglicemia, polidipsia e a polifagia em animais diabéticos induzido por STZ no período neonatal. A pioglitazona também foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina, além de recuperar a massa adiposa e os níveis plasmáticos de insulina, indicando que não somente os baixos níveis de insulina, mas a carência de tecido adiposo pode exercer um significante papel na patofisiologia desse modelo em particular.

Uma grande quantidade de hormônios regulam o desenvolvimento, diferenciação e função do tecido adiposo, promovendo catabolismos (como as catecolaminas) ou anabolismo (como a insulina). Outros exercem um efeito permissivo, como por exemplo os glicocorticoides e outros, como os hormônios tireoidianos. São importantes nas primeiras etapas da embriogênese do tecido adiposo. Além desses hormônios, outras moléculas também agem sobre o tecido adiposo como, por exemplo, o TNF-α, a IL-6 e a melatonina, dentre outros (Fonseca-Alaniz et al., 2006).

Em seres humanos e ratos, já foi sugerida uma relação entre a glândula pineal e o metabolismo energético há muito tempo (Alcozer et al., 1956; Diaz, Blasquez, 1986; Milcu et al., 1971). Entretanto, uma relação funcional entre a glândula pineal e o tecido adiposo se tornou mais evidente após estudos pioneiros com adipócitos isolados de tecido adiposo branco incubados com a melatonina, mostrando que esse hormônio aumenta a sensibilidade à insulina, medida através de testes de captação de glicose (Lima et al., 1994), e que a pinealectomia leva ao desenvolvimento de resistência à insulina, com redução do conteúdo e da expressão gênica de GLUT4 nesse tecido (Lima et al., 1998).

Alonso-Vale e colaboradores (2004) demonstraram que a pinealectomia acentuou a resistência insulínica ao longo do jejum, ao mesmo tempo em que reduziu a atividade anabólica de adipócitos determinada por testes biológicos *in vitro*, isto é, intensificou a oxidação de glicose e reduziu a síntese de lipídios (Alonso-Vale et al., 2004).

Em adipócitos isolados, a melatonina exerceu agudamente (6 horas de incubação) um efeito permissivo, fundamental para a ação da insulina sobre a expressão gênica de leptina, uma adipocina produzida pelo tecido adiposo branco e esse efeito da melatonina sobre a síntese e secreção da leptina se dá por sua ação em receptores do subtipo MT1 (Alonso-Vale et al., 2005). Esses dados revelam uma participação importante da melatonina sobre a regulação de expressão gênica de leptina, bem como o seu papel modulador sobre a ação de outros hormônios.

Em outro estudo, em adipócitos isolados, a melatonina aumentou o grau de fosforilação em tirosina de IRβ em resposta à insulina, sem modificar o seu conteúdo proteico total. Esse efeito parece ser transmitido através da cascata intracelular da insulina, já que um aumento de fosforilação em serina da proteína AKT também foi evidenciado (Alonso-Vale et al., 2005). A habilidade da melatonina em ativar a sinalização da insulina (envolvendo a ativação de IR e do substrato do receptor de insulina 1 [IRS1]) também foi demonstrada em hipotálamo de ratos (Anhê et al., 2004).

Desse modo, a resposta à insulina é modulada pela melatonina, e essa interação não está limitada aos aspectos metabólicos, mas abrange outras funções do adipócito, interferindo com a sua habilidade de funcionar como um órgão endócrino. Para o esclarecimento do mecanismo básico desse sinergismo

melatonina/insulina, principalmente no tecido adiposo, são necessárias ainda mais investigações.

Tendo em vista as evidências expostas acima, é relevante investigar o efeito do tratamento de animais diabéticos com melatonina associada ou não com pioglitazona sobre o quadro metabólico desses animais e qual a repercussão desses tratamentos sobre o metabolismo do tecido adiposo, dando ênfase na resposta à insulina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente trabalho é verificar se o tratamento oral crônico com melatonia, iniciado logo após o desmame, com ou sem associação com a pioglitazona, é capaz de recuperar os parâmetros metabólicos, a massa adiposa e a capacidade metabólica do tecido adiposo de animais diabéticos, bem como o efeito sobre a capacidade secretora de insulina pelas células β pancreáticas.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos dos tratamentos sobre os parâmetros metabólicos, tais como evolução do peso corporal, glicemia semanal, consumo alimentar e hídrico, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina de animais diabéticos *in vivo*;
- Avaliar o efeito do tratamento sobre a concentração plasmática de adiponectina, glicose, frutosamina, insulina, leptina e testosterona dos ratos em jejum;
- Avaliar os efeitos dos tratamentos sobre a massa adiposa, o tamanho dos adipócitos e a capacidade metabólica de adipócitos isolados dos tecidos adiposos subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal;
- Avaliar a capacidade secretora de insulina pelas ilhotas pancreáticas dos animais diabéticos com e sem tratamento;
- Obsevar as alterações na maturação sexual dos animais diabéticos e os efeitos dos tratamentos sobre essas alterações;
- Analisar as alterações produzidas pelo diabetes e pelo tratamento na expressão proteica e gênica de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina e no processo de lipogênese e lipólise.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Foram utilizados ratos Wistar machos obtidos a partir do cruzamento monitorado do tipo “harém” (duas fêmeas e um macho) em biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o objetivo de se identificar o dia exato do nascimento do animal. Os animais utilizados para o cruzamento foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As fêmeas grávidas foram transferidas para caixas individuais e assim permaneceram com sua ninhada até o período de desmame (21 dias após o nascimento). Os ratos foram mantidos nesse biotério de experimentação em caixas coletivas (46 x 24 x 20 cm, com 3-4 animais/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25 ºC, período de iluminação claro/escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 6h) e exaustão de amônia controlada. Os animais receberam ração balanceada padrão (Nuvital®) e água ‘*ad libitum*’.

3.2 Desenho experimental

A indução do DM foi realizada através da injeção intraperitoneal (dose única) de STZ (120 mg/kg de p.c.) no 5º dia de vida dos animais, com um jejum prévio de 8 horas (mediante separação das mães). A droga foi preparada com tampão citrato (citrato de sódio dissolvido em solução salina 0,9%, 10 mM, pH 4,5). Esses animais retornaram para junto das mães, permanecendo com elas até o período para o desmame (21 dias) e foram distribuidos nos seguintes grupos experimentais (com o n de 6 a 7 animais cada): grupo controle (C), animais não diabéticos que receberam apenas veículo (citrato) no 5º dia de vida e permaneceram sem nenhum tratamento adicional; grupo diabético (D), animais diabéticos que não receberam nenhum tratamento adicional; grupo melatonina (M), animais diabéticos que foram tratados

com melatonina (1mg/kg/dia, dissolvido em etanol 0,04% na água de beber durante o período escuro) desde o desmame até a 12ª semana de vida e grupo MP, animais diabéticos que receberam tratamento com melatonina (1mg/kg) associado com pioglitazona (5mg/kg, v.o. em “bolus” por gavagem, às 18h) desde o desmame até a 12ª semana de vida. As garrafas contendo melatonina foram preparadas diariamente e a concentração de melatonina foi ajustada de acordo com o peso corporal e o consumo de água dos animais duas vezes por semana. A dose de pioglitazona utilizada neste estudo foi definida baseada em estudos prévios (Takada et al., 2008).

3.3 Parâmetros de desenvolvimento corporal e maturação sexual

O tratamento se estendeu da quarta à décima segunda semana de vida do animal e, na sua vigência, alguns parâmetros foram avaliados. A glicemia foi monitorada constantemente (2 vezes por semana) através da coleta de um pequeno volume de sangue pela cauda do animal pela manhã e sua determinação feita por glicosímetro (Lifescan, Scotland, UK). Com a mesma frequência foi medido o peso corporal e o consumo de água e ração.

Além desse acompanhamento, a caracterização do desenvolvimento corporal e da maturação sexual também foi realizada através das medidas, no dia do sacrifício, do peso corporal e comprimento naso-anal (para cálculo do índice de Lee) e medidas do peso dos testículos, epidídimos, canais deferentes e vesículas seminais.

O índice de Lee foi calculado com a seguinte fórmula:

$$[\text{peso (g)}^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)}] \times 100$$

3.4 Teste oral de tolerância à glicose (G.T.T. Oral)

Para a determinação da curva glicêmica após sobrecarga de glicose oral, os animais, na 10ª semana de vida, em jejum prévio de 12 horas, receberam uma dose de glicose (750 mg/kg p.c.) por gavagem. Realizou-se a medida da glicemia capilar caudal, através de glicosímetro (*One Touch Ultra, Johnson & Johnson’s)*, nos seguintes tempos: 0 (pré-gavagem), 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de glicose. A partir dos valores das curvas glicêmicas de cada animal,

foi calculada a área incremental sobre a curva (AUC) utilizando-se o software GraphPad Prism Versão 5.0 para windows.

3.5 Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITTiv)

Na 10ª semana de vida, após jejum de 12 horas, foi injetada insulina regular (Novo Nordisk, Montes Claros, M.G., Brasil, 750 mU/kg p.c.) por via intravenosa na veia peniana. A glicemia foi determinada por meio de glicosímetro (One Touch Ultra® Johnson & Johnson's) em amostras de sangue retiradas da cauda nos tempos 0 (pré-injeção), 3, 6, 9, 12, 15, 20, 30 e 60 min após a administração de insulina. Os valores obtidos entre os tempos de 3 a 15 minutos foram usados para calcular a constante da taxa de desaparecimento da glicose plasmática (K_{ITT}), mediante análise da curva de decaimento (pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows) de acordo com método proposto por Bonora et al. (1989).

3.6 Sacrifício dos animais e extração dos tecidos

Os animais foram sacrificados na 12ª semana de vida, em jejum prévio de 12 horas, sob anestesia (Tiopentax – 20mg/kg p.c.) às 8h por decapitação, à qual se seguiu a coleta de sangue do tronco em tubos sem anticoagulante para posterior análise da glicemia, insulinemia, leptinemia, adiponectinemia, testosteronemia e outras dosagens. O soro foi obtido mediante a centrifugação a 4°C a 849,5 g durante 20 minutos e armazenado a -80°C até a execução das dosagens. Foram coletados e pesados os tecidos adiposos brancos subcutâneo (SC), peri-epididimal (PE), retroperitoneal (RP) e os adipócitos isolados para realização de testes biológicos *in vitro*. Amostras dos 3 coxins adiposos foram armazenadas a -80ºC para posterior análise da expressão proteica por *western blotting*. O pâncreas também foi coletado para o isolamento das ilhotas com a finalidade de quantificar a capacidade secretora de insulina. As estruturas do sistema reprodutor (testículos, epidídimos, canais deferentes e vesículas seminais) também foram coletadas e pesadas.

3.7 Determinações bioquímicas e hormonais

3.7.1 Determinação das concentrações séricas de glicose, frutosamina, triacilglicerol (TAG), ácidos graxos livres (AGL), colesterol total e HDL-colesterol

As concentrações séricas de glucose, frutosamina, TAG, cholesterol total e AGL foram determinadas pelo método enzimático utilizando-se os seguintes kits comerciais. Glicose (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil): concentração mínima detectável de 2 mg/dL, e o coeficiente de variação interensaio (CV) de 1,6%. Frutosamina (Lab test MG, Brasil): concentração mínima detectável de 5 μmol/L e CV interensaio < 2,5%. TAG (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil): concentração mínima detectável de 3 mg/dL e CV interensaio < 2,0%. Colesterol total (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil): concentração mínima detectável de 2 mg/dL e CV interensaio < 3.0%. AGL (Wako NEFA C test kit, ACS-ACOD Method; Wako Chemicals, Richmond, VA, USA): concentração mínima detectável de 0,0014 mEq/L, e CV intraensaio < 2,7% e CV interensaio < 10%. As medidas foram realizadas em duplicatas em um volume de 50 μL de amostra. HDL-colesterol foi determinado pelo método de precipitação (LABORLAB, Guarulhos, SP, Brasil).

3.7.2 Determinação da concentração sérica de insulina, adiponectina, leptina e testosterona.

As concentrações séricas de insulina, leptina e adiponectina foram determinadas usando kits de radioimunoensaio específicos para rato (Millipore Corporation, St Charles, MO, USA). Insulina: sensibilidade de 0,0329 ng/mL. O CV intraensaio < 5,8% e CV interensaio < 10.8%. O ensaio foi realizado em duplicara em 100 μL de amostra. Leptina: sensibilidade de 0,639 ng/mL. CV intraensaio < 4,6% e CV interensaio < 5,7%. O ensaio foi realizado em duplicara em 100 μL de amostra. Adiponectina: sensibilidade de 1 ng/mL. CV intraensaio < 4,5% e CV interensaio < 8,3%. O ensaio foi realizado em duplicara em 100 μL de amostra (o soro foi diluído na proporção de 1:1000). A concentração sérica de testosterona foi determinada usando o kit específico para testosterona (Coat-A-Count total testosterone radioimmunoassay kit - Siemens Healthcare Diagnostic Inc. Los Angeles, CA, USA). A sensibilidade desse kit é de 4 ng/mL e o CV interensaio < 12%. O ensaio foi realizado em duplicara em 50 μL de amostra.

A resistência à insulina foi calculada usando o índice HOMA como definido pela equação: HOMAir = (glicose em jejum mmol/L X insulina em jejum μU/L)/22,5. A estimativa da função da célula β foi calculada usando o modelo do HOMA 1-% B definido pela equação: HOMA 1-% B = (insulina em jejum μU/L x 20) / (glicemia em jejum mmol/L – 3,5) (Matthews et a., 1985).

3.8 Isolamento dos adipócitos e análise morfométrica

Os adipócitos foram isolados mediante a técnica de digestão de tecido por colagenase, descrita por Rodbell (1964), com algumas modificações para adaptar o método às nossas condições laboratoriais.

Em resumo, os coxins adiposos SC, PE e RP foram retirados, picados com tesoura em finos fragmentos e incubados em 4,0 mL de tampão digestivo [DMEM, HEPES 25 mM, BSA 4 %, colagenase tipo II (Sigma Chemical, St. Louis, MO, Estados Unidos) 1,25 mg/mL, pH 7,45] por cerca de 30 minutos a 37 ^{o}C em banho-maria com agitação orbital (150 rpm). Em seguida, a amostra foi filtrada em peneira plástica com malha fina (que retém restos teciduais e vasos não digeridos) e lavada por três vezes com 25 mL de tampão EHB (sais de EARLE, HEPES 25 mM, BSA 1%, piruvato de sódio 1 mM, sem glicose, pH 7,45) mantido a 37 ºC. Para determinação do lipócrito (porcentagem de adipócitos contidos na suspensão celular total), aproximadamente 40 μL da suspensão celular em tampão EHB foram colocados em capilar de vidro e submetidos à centrifugação (2000 rpm por 1 min). O volume total da suspensão corresponde a 100 % e o volume de adipócitos obtido após a centrifugação nos fornece o lipócrito da amostra.

Para análise morfométrica, alíquotas de suspensão celular foram avaliadas em microscópio óptico (aumento de 100x) acoplado à câmera digital 1.3 MP (Moticam 1000 - MOTIC). Utilizou-se o programa Motic-Images Plus 2.0 para medição da área transversal celular, da qual se obteve o raio celular médio. Em cada preparação são medidas 100 células. A partir do diâmetro celular médio e admitindo-se que o adipócito isolado é esférico, o volume e o número de células são calculados de acordo com as seguintes fórmulas:

(a) **V**= [(π/6) x **D**^{3}]/1000, (b) **N**= (lipócrito x 10^7)/ **V**

Onde:

D é o diâmetro médio de 100 adipócitos (μm), **N** é o número de células e **V** é o volume médio (Di Girolamo; Mendlinger; Fertig, 1971). A divisão por 1000 em (a) visa expressar o volume em picolitros (pL).

3.9 Cálculo indireto da celularidade

O cálculo indireto da celularidade do tecido adiposo foi realizado através da relação entre a massa total do coxim adiposo e a massa de um adipócito:

$$\text{Celularidade} = \frac{\text{massa do tecido (ng)}}{\text{massa de um adipócito (ng)}}$$

A massa de um adipócito é calculada a partir da fórmula da densidade:

$$D = \frac{m}{v}$$

onde, D = densidade média do adipócito

m = massa média de um adipócito

v = volume médio do adipócito

Sendo a densidade média do adipócito igual a 0,91, tem-se:

$$m = 0{,}91 \times v$$

3.10 Isolamento da ilhota pancreática e avaliação da capacidade secretora de insulina

Após a retirada dos coxins adiposos, o ducto biliar comum foi exposto e clampeado em sua extremidade distal, junto ao duodeno e dissecado próximo ao pedículo hepático, por onde foi introduzida uma cânula de polietileno. Para provocar a distensão do tecido acinar, 15 a 20 mL de solução de Hanks (Nacl 137 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 1 mM, Na_2HPO_4 0,4 mM, $NaHCO_3$ 4mM, equilibrada com

carbogênio – mistrura de O_2/CO_2 95:5 v:v), com glicose (5,6 mM) e colagenase (0,7 mg/mL – Collagenase Type V – Sigma) foi injetada na cânula.

Gânglios linfáticos, gordura e vasos sanguíneos foram dissecados logo após a remoção do pâncreas. Em seguida, o pâncreas foi fragmentado em 4 a 5 pedaços com o auxílio de uma tesoura de ponta arredondada. Os fragmentos foram transferidos para um tubo de 50 mL e incubados em banho-maria a 37°C por cerca de 25 minutos. O tubo então foi completado com solução de Hanks até 30 mL e agitado manualmente em banho-maria (37°C) por 1 minuto. Com a finalidade de favorecer a completa digestão da parte exócrina do pâncreas, o tubo foi agitado por mais um minuto fora do banho-maria. O produto da digestão foi transferido para um recipiente contendo solução de Hanks. A mistura foi deixada em repouso por 4 minutos logo após a homogeneização e, em seguida, o sobrenadante foi aspirado. Adicionou-se cerca de 60 mL de solução de Hanks à mistura e esta (produto da digestão + solução de Hanks) foi novamente homogeneizada. Esse procedimento de lavagem foi repetido por 3 a 4 vezes. O produto final foi transferido para uma placa de Petri de fundo escuro e as ilhotas foram coletadas com o auxílio de um capilar estirado e uma lupa, sendo mantidas em gelo durante toda a coleta.

Lotes de cinco ilhotas por poços foram incubadas a 37 ^{o}C em tampão Krebs-Henseleit (Na^+ 139 mM, K^+ 5 mM, Ca^{2+} 1 mM, Mg^{2+} 1 mM, Cl^- 124 mM, HCO_3^- 24 mM, pH 7,4) contendo albumina (0,2%) por 20 minutos e 5,6 mM de glicose. Após essa pré-incubação, o sobrenadante foi descartado e as ilhotas foram incubadas em 0,5 mL do mesmo tampão contendo 5,6 ou 16,7 mM de glicose. Sessenta minutos depois, o meio de incubação sobrenadante (0,3 mL) foi coletado para a medição de insulina por radioimunoensaio.

3.11 Ensaios biológicos em adipócitos isolados

Os ensaios biológicos foram realizados em adipócitos isolados dos coxins adiposos subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP).

3.11.1 Teste de Captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([^{3}H]-2DG) em Adipócitos Isolados

As taxas de captação de [^{3}H]-2-desoxi-D-glicose ([^{3}H]-2DG) em adipócitos isolados foram mensuradas na ausência (basal) e na presença (de concentração maximamente estimulante, 10 nM) de insulina. A [^{3}H]-2DG é captada pela célula e é transformada em [^{3}H]-2-deoxifrutose-6-fosfato ([^{3}H]-2DG-6-P), porém, a partir desta etapa, não é mais metabolizada, além de atuar como inibidor alostérico da enzima subsequente da via glicolítica, a fosfo-glico-mutase (PGM).

Alíquotas de 40 μL de suspensão celular foram pipetadas em tubos plásticos, contendo ou não 2 μL de insulina (concentração final de 10 nM) e incubadas por 15 minutos a 37 °C. Em seguida, foram adicionados 10 μL de [^{3}H]-2DG (concentração final de 0,4 mM e 0,05 μCi/tubo). Passados 3 minutos exatos, o transporte foi interrompido com a adição de 250 μL de phloretin 0,6 mM (em E.H.B e DMSO 0,05%) a 4 ^{o}C. Para avaliação da captação, 200 μL da mistura final foram transferidos para tubos de microcentrífuga (0,4 mL) contendo 200 μL de óleo de silicone (densidade 0,963 g/mL) que foram centrifugados por 10 segundos em microcentrífuga (Microfuge E, Beckman Instruments Inc. Palo Alto, Califórnia, EUA). A centrifugação teve como objetivo separar a mistura em três fases: uma superior, contendo células compactadas (agregado celular), uma intermediária, correspondente ao óleo de silicone, e a mais inferior, constituída pelo tampão aquoso. Feito isso, foi recolhido o agregado celular mediante a secção do tubo com um estilete na altura da porção média da camada de óleo de silicone.

Após a separação, a porção contendo o agregado celular foi transferida para um tubo contendo 2,5 mL de líquido de cintilação (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) e a radiação emitida foi aferida em contador beta (Micro Beta Trilux 1450LsC luminecense counter, PerkinElmer).

Foi realizada uma determinação de incorporação inespecífica no agregado celular, onde se quantificou a radioatividade ali retida e que não foi captada pela célula. Esse valor foi subtraído do resultado obtido no final do teste. Isso garante que a contaminação presente no agregado celular não interfira no resultado da

captação propriamente dito. Para a determinação da incorporação inespecífica, foram adicionados, primeiramente a suspensão celular (40 µL) em um tubo de ensaio e em seguida, o phloretin (inibidor do transporte de glicose), antes de se acrescentar [^{3}H]-2DG. Os resultados foram expressos em pmol/cm^2 de superfície celular.

3.11.2 Teste de incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Acetato em lipídeos e oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose e [2-^{14}C]-Acetato até $^{14}CO_2$ em adipócitos Isolados

Adipócitos (concentração final 30-40%) em tampão Krebs/Ringer/Fosfato/BSA 1%/glicose 5 mM, pH=7,4 a 37 ^{o}C, saturado de uma mistura gasosa de carbogênio 5%, foram pipetados em tubos de ensaio de polipropileno 17x100 mm contendo D-[U-^{14}C]-glicose ou [2-^{14}C]-Acetato (0,05 µCi/tubo), com ou sem insulina (10 nM) (No teste com [2-^{14}C]-Acetato não houve estímulo com insulina). Esses tubos foram vedados com tampas de borracha. A seguir, os tubos foram enriquecidos de uma atmosfera com 95 % de O_2 e 5 % de CO_2 e incubados por 60 minutos em banho-maria a 37 ^{o}C. Ao término da incubação, 0,2 mL de H_2SO_4 (8N) foi pipetado sobre a mistura de reação e um flaconete com papel de filtro (2x4 cm, embebido com 0,2 mL de etanolamina) foi acoplado emborcado (para adsorver o $^{14}CO_2$ liberado da reação). Incubou-se por mais 30 minutos, após isso, o flaconete contendo o papel filtro foi preenchido com coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada. Os resultados foram expressos em nmol.10^{-6} células. h^{-1}.

Em seguida, foi realizada a extração dos lipídeos mediante a adição de 2,5 mL de reativo de DOLE (isopropanol:n-heptano:H_2SO_4 8N, 4:1:0.25 v:v:v) no meio de incubação. Agitou-se a mistura por 4-5 vezes (sessões de 10 segundos) em vórtex durante 30 minutos. Ao final do período, foram adicionados 1,5 mL de n-heptano e 1,5 mL de água deionizada. Após a agitação em vórtex, deixou-se a mistura decantar e alíquotas de 0,5 mL da fase superior (contendo os lipídeos extraídos no n-heptano) foram transferidas para flaconetes contendo 2,5 mL de coquetel de cintilação biodegradável (EcoLume^{TM}, ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) para contagem da radioatividade beta incorporada. Os resultados foram expressos em nmol.10^{-6} células. h^{-1}.

3.11.3 Teste de avaliação da atividade lipolítica frente a estímulo com isoproterenol

Adipócitos isolados foram incubados em tampão Earle/Hepes sem glicose, pH 7,4 na presença (máxima) ou ausência (basal) do agonista β-adrenérgico isoproterenol (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). As células foram previamente tratadas por 30 minutos com adenosina (Sigma, 0,2 μM). Em seguida, acrescentou-se adenosina desaminase (ADA, Sigma, 0,2 U/mL em tampão EHB, pH 7,45) e incubou-se por mais 30 minutos (para possibilitar a degradação da adenosina liberada pelos adipócitos, pois esta tem ação anti-lipolítica e pode mascarar os resultados). Em seguida, foi adicionado isoproterenol (1 μM) e o tempo de incubação foi de 60 minutos a 37 °C e, ao final, a mistura de incubação (volume total de 200 μL) foi centrifugada em microcentrífuga refrigerada a 4 °C por 5 minutos a 7000 rpm. Alíquotas (120 μL) do infranadante foram coletadas para a determinação da concentração de glicerol liberado pelas células pelo método enzimático-colorimétrico, utilizando o kit de determinação de glicerol livre (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos).

Procurando diminuir ainda mais qualquer influência não específica nos resultados, foi feita uma incubação, a qual seguiu todos os procedimentos acima descritos, exceto a adição de isoproterenol e a subsequente incubação da mistura por 60 minutos. O valor obtido nessa determinação (considerado como liberação não específica de glicerol) foi descontado das demais (basal e estimulada por isoproterenol).

3.12 Quantificação de proteínas por *Western Blotting*

3.12.1 Extração de proteínas

Inicialmente, o tecido adiposo epididimal foi pesado e, posteriormente, foi mantido submerso em tampão de extração em tubos *eppendorfs* até a extração.

O tecido foi, então, homogeneizado em tampão de extração contendo 20 mM TrisHCl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 2% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, (pH 8,0), 10% glicerol, 20 mM Fluoreto de Na, 30 mM pirofosfato de sódio, 0,2% SDS, 0,5% deoxicolato de sódio, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 1 mM ortovanadato de sódio), 50 μM leupeptina, 5 μM aprotinina. Para a homogeneização utilizou-se

homogeneizador elétrico tipo Polytron (PT 3100, Kinematica AG) na velocidade máxima, em 3 *burst* de cerca de 10 segundos. Entre a homogeneização de diferentes amostras, o homogeneizador foi lavado em álcool 70 %, água ultrapura e tampão de extração, nessa ordem. Durante todo o processo de homogeneização, os tubos contendo as amostras foram mantidos no gelo, no intuito de reduzir a atividade de fosfatases e enzimas proteolíticas.

As amostras foram, então, centrifugadas por 15 minutos a 12000 g e temperatura estabilizada em 4 ºC. Após a centrifugação, coletou-se a amostra infranadante, entre a camada superior de gordura (*fat cake*) e o pelette localizado no fundo do eppendorf, o qual foi transferido para outro tubo, onde foram feitas alíquotas e armazenado em freezer (-80 ^{o}C).

3.12.2 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado segundo protocolo descrito por Sambrook et al., 1989 e Harlow, Lane, 1988 descrito sucintamente a seguir. Foram preparados géis em bicamada, sendo a camada superior (gel de empacotamento) constituída de acrilamida a 5 %, 125 mM Tris (pH 6,8), 0,1 % SDS, 0,1 % persulfato de amônia e 0,1 % TEMED. Os géis inferiores (resolutivos) foram preparados com poliacrilamida na concentração de 6 a 10 %, 380 mM Tris (pH 8,8), 0,1 % persulfato de amônio e 0,077 % TEMED.

3.12.3 Preparo de lisado de proteínas para SDS-PAGE e "Western blotting"

As amostras foram combinadas com tampão de amostra contendo 240 mM Tris, (pH 6,8), 40 % glicerol, 0,8 % SDS, 200 mM beta-mercaptoetanol e 0,02 % azul de bromofenol. Amostras contendo 50 µg por "poço" foram submetidas à eletroforese no gel de poliacrilamida, inicialmente a 60 V. Uma vez que as proteínas atravessaram o gel de empilhamento, a voltagem foi aumentada para 120 V, sendo mantida até o final da corrida.

3.12.4 Transferência de proteínas do gel para a membrana (nitrocelulose)

O gel contendo as proteínas separadas por eletroforese foi incubado por 10 minutos em tampão de transferência (3 mM glicina, 48 mM Tris base, 0,037 % SDS , 20 % metanol, pH 8,3). Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi hidratada e, então, incubada em tampão de transferência. Um "sanduíche" foi então montado na seguinte ordem: esponja, 2 folhas de papel filtro de 3 mm, gel, membrana, 2 folhas de papel de filtro de 3 mm (Whatman) e esponja. A transferência de proteínas do gel para a membrana foi realizada em cuba de eletroforese, na presença de tampão de transferência, sob corrente de 25 V, por 90 minutos. A eficiência da transferência foi verificada corando-se a membrana, por 5 minutos, com corante Ponceau (1 % ponceau, 1 % ácido acético), seguida de lavagem com PBST [8 % NaCl, 0,2 % KCl, 0,2 % $KH_2(PO)_4$, 1,15 % $Na_2H(PO)_4$, 0,5 % Tween20].

3.12.5 Sondagens das proteínas com anticorpos

Os sítios das membranas sem proteínas foram bloqueados com albumina bovina a 5 %, em tampão PBST, por 60 minutos, sob agitação. O anticorpo específico para cada proteína de interesse foi diluído (de acordo com a recomendação do fabricante) em PBST e utilizado para a incubação das membranas *overnight* sob agitação a 4 ^{o}C. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 minutos, com PBST e incubada com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com peroxidase de raiz forte, diluído 1:5000 em PBST, por 1 h, sob agitação a 4 ^{o}C. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 minutos, com agitação.

3.12.6 Revelação com sistema Quimioluminescente

A solução de revelação foi preparada pela mistura de volumes iguais dos reagentes 1 e 2 do kit ECL *Advance* (GE Healthcare) composto por luminol, fenol e peróxido de hidrogênio e a mistura foi utilizada para umedecer as membranas. Os blots foram então visualizados por um sistema de bioimagem ImageQuant™ 400

(GE Healthcare) que capturou imagens por 5 a 20 minutos e analisadas por um software ImageQuant TL (GE Healthcare).

3.13 Análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativo – qPCR

3.13.1 Extração de RNA Total

Amostras de 200 mg dos tecido adiposo PE (de 4 a 6 animais por grupo) foram homogeneizadas em Polytron (PT 3100, Kinematica AG) por 30 segundos com Trizol na proporção de 1mL para cada 100 mg de amostra, seguindo-se as especificações do fabricante (Trizol Reagent, Invitrogen, Life Technologies, PA, Estados Unidos). A seguir, os homogenatos foram aliquotados em tubos de 1 mL e armazenados a -80°C para posterior extração.

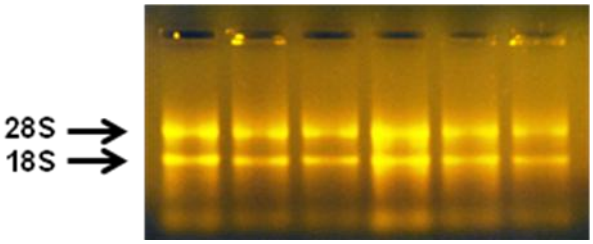
Na etapa da extração, as amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente (15-25°C) para permitir a completa dissolução dos complexos nucleoproteicos. Em seguida, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado aos tubos, agitando-se vigorosamente em vórtex, por 15 segundos, com posterior incubação à temperatura ambiente por 2 a 3 minutos. A mistura foi centrifugada a 12000 x *g* por 15 minutos, a 4°C com a formação de 3 fases. A fase aquosa superior, contendo RNA, foi transferida para outro tubo e a purificação do RNA foi feita por coluna seguindo o protocolo do Kit manufaturado PureLink RNA Mini Kit (Cat. No. 12183-018A, Ambion by Life Technologies).

O RNA total foi quantificado em leitura espectrofotométrica em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA) a 260 nm. Para análise da pureza do RNA, adotou-se o cálculo da razão do valor da absorbância a 260 nm pelo valor da absorbância a 280 nm (comprimento de onda definido para leitura de proteínas), onde se estipula como razão ideal para aceitação da amostra o intervalo entre 1,6-2,0. Alíquotas de 8 μL de amostras contendo 1 μg de RNA total diluído em água DEPC foram armazenadas a -80°C.

Para confirmar a integridade do RNA extraído, 2 μg de cada amostra foram submetidos à eletroforese em minigel de agarose 1% (em ácido morfolinopropanosulfônico [MOPS] 200 mM, acetato de sódio 50 mM, EDTA 0,5

mM, pH 8,0; solução 10x concentrada, pH 7,0) com formaldeído 4% e corado com 1μg/mL de brometo de etídio (figura 1).

Figura 1 - Gel para verificar a integridade do RNA total extraído.



As bandas ilustradas representam as subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal.
Fonte: Oliveira (2012).

3.13.1 Síntese de cDNA por transcrição reversa

Na etapa inicial, pipetou-se 1 µL de tampão de DNAse (10x) e 1µL da enzima DNAse (1 U/µL) em tubos contendo 1 µg de RNA total. A mistura foi incubada a 25°C por 15 minutos com a finalidade de evitar uma possível amplificação de DNA genômico, que pode contaminar o RNA extraído. A seguir, adicionou-se 1 µL de EDTA 25mM e a mistura foi submetida à incubação a 65°C por 10 minutos. Na etapa seguinte (síntese de DNA), pipetou-se 1 µL de oligo DTs 146 ng/ µL, seguido de incubação a 70 °C por 10 minutos. Terminada a reação, 4 µL de tampão da enzima transcriptase reversa (5x), 2 µL de ditiotreitol (DTT) 0,1M, 1 µL de mistura de dNTPs 10 mM foram adicionados à mistura, que foi então incubada a 25 °C por 10 minuntos e, em seguida, a 42 °C por 2 minutos. Na etapa final, 1 µL da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen) foi acrescentada à mistura, que foi submetida à incubação a 42 °C por 50 minutos e mais 15 minutos a 70°C. As incubações foram realizadas em termociclador (Eppendorf). O material obtido (cDNA) foi então mantido em freezer a -20 °C até a realização da próxima etapa – amplificação por PCR.

3.13.2 PCR quantitativo (real time)

Alícotas de 2 µL de amostra de cDNA obtida a partir da reação de RT foram adicionadas a um *mix* contendo 2,5 µl de água DEPC autoclavada, 5 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied biosystems, código do produto: 4304437), 0,5 µl de TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x (para rato e específico para cada gene) contendo os dois primers para PCR e uma sonda MGB TaqMan® marcada com FAM em um mix preformulado na concentração de 20x, na concentração final 1x de 250nM de sonda e 900nM de cada primer (a tabela 1 mostra a lista dos kits inventoriados utilizados com seus respectivos números de catálogo). As reações de PCR foram realizadas em aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). A reação de PCR inicia-se com um período 2 minutos para ativação da AmpErase® UNG seguida de 10 minutos a 95º C para a ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase. Essa fase só ocorre no primeiro ciclo de reação. As etapas seguintes envolvem desnaturação da fita de cDNA a temperatura de 95º C por 15 s seguida da fase de anelamento do primer e extensão da fita por 1 minuto na temperatura de 60º C. Essas 2 fases se repetiram a cada ciclo por 40 ciclos.

A análise da expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método de CT comparativo (ΔΔCT).

3.13.3 Quantificação relativa – Método de CT comparativo (ΔΔCT)

Análise comparativa entre a expressão do gene alvo e de uma amostra calibradora, normalizadas por um controle endógeno (*housekeeping*).

$$\Delta C_T = C_T \text{ (alvo)} - C_T \text{ (endógeno)}$$

$$\Delta C_T = C_T \text{ (calibrador)} - C_T \text{ (endógeno)}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ (amostra)} - \Delta C_T \text{ (calibrador)}$$

$$\text{Quantidade relativa} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

TABELA 1 – Lista de kits inventoriados (Applied Biosystems, TaqMan® Gene Expression Assay Mix 20x).

Gene	Sigla de catálogo	Nº de catálogo
β-actina	ACTB	Rn_00667869
5-monooxygenase Activation protein, zeta polypeptide	YWHAZ	Rn_00755072
Ácido graxo sintase	FASN	Rn_00569117
Adiponectina	ADIPOQ	Rn_00595250
ATP-citrato liase	ACLY	Rn_00566411
C/EBPβ	CEBPB	Rn_00824635
C/EBPα	CEBPA	Rn_00520963
Ciclofilina	PPIA	Rn_00690933
Proteína de ligação de ácidos graxos	FABP4	Rn_00670361
Glicose-6-P desidrogenase	G6PDH	Rn_00566576
Hipoxantina fosforibosyltransferase 1	HPRT1	Rn_01527840
Leptina	LEP	Rn_00565158
Lipase hormônio sensível	LIPE / HSL	Rn_00563444
Microglobulina B2	B2M	Rn_00560865
Perilipina	PLIN	Rn_00558672
PPARγ	PPARG	Rn_00440945
Proteína ribossomal l 37-a	RPL37A	Rn_02114291
Receptor de andrógeno	AR	Rn_00560747
Receptor de insulina	INSR	Rn_00567070

Fonte: http://www.appliedbiosystems.com.br

3.13.4 Seleção de controles endógenos (housekeeping)

Realizou-se reações de qPCR para cada possível controle endógeno (β-actina (Actb), ciclofilina (Ciclo), microglobulina B2 (B2M), proteína ribossomal l 37-a (RPL 37-a), hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT-1), tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ)) utilizando-se amostras dos animais submetidos ao protocolo experimental da pesquisa (grupos C, D, M e MP). Os resultados são submetidos à análise no programa GENORM para a escolha, utilizando-se amostras de controle endógeno com menor variação para o protocolo experimental da pesquisa que, nesse tecido e para esse modelo experimental, foi a β-actina e ciclofilina. Como foram escolhidos dois controles endógenos, foi utilizada a média geométrica dos CTs para o cálculo do ΔΔCT descrito acima.

3.14 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. O teste Two-way ANOVA com medida repetida, seguido de Bonferroni, foi utilizado para comparação da curva de evolução do peso e da glicemia semanal, do perfil glicêmico durante o GTTpo e ITTiv e para comparar a captação de [^{3}H]-2DG, a oxidação da glicose e a incorporação de glicose em lipídios basal versus maximamente estimulada com insulina. Para as demais comparações foi adotado ANOVA One-way, seguido de Tukey.

As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Spftware, San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do tratamento no peso corporal, na glicose plasmática e em outros parâmetros

Os animais do grupo diabético (D) apresentaram menor ganho de peso em relação ao controle. O tratamento com melatonina sozinha ou em associação com pioglitazona não foi capaz de recuperar o ganho de peso dos animais diabéticos. O grupo M apresentou peso significativamente menor ($p < 0,05$, $n = 6$ a 7 animais por grupo) em relação ao grupo D, da 6ª à 9ª semana de tratamento, porém no final do tratamento os dois grupos apresentaram peso semelhante (figura 2). Entretanto, tratamento com melatonina foi capaz de manter a glicemia dos animais diabéticos significativamente menor ($p < 0,05$) que dos animais do grupo D (figura 3). Caracteristicamente, nesse modelo de diabetes, o desenvolvimento da hiperglicemia é insidioso e apresenta um aumento por volta da 7ª semana de vida do animal. Esse aumento na glicemia não foi observado nos grupos M e MP.

Paralelamente observou-se o consumo de ração e água. Os animais diabéticos (grupo D) apresentaram polifagia e polidipsia. O tratamento com melatonina, associada ou não com a pioglitazona (grupos M e MP), evitou que essa condição se instalasse. Na tabela 2, pode-se observar que o consumo de água e ração dos grupos M e MP, durante a última semana, foi estatisticamente menor ($p < 0,05$) que o consumo dos animais diabéticos e semelhante ao grupo controle.

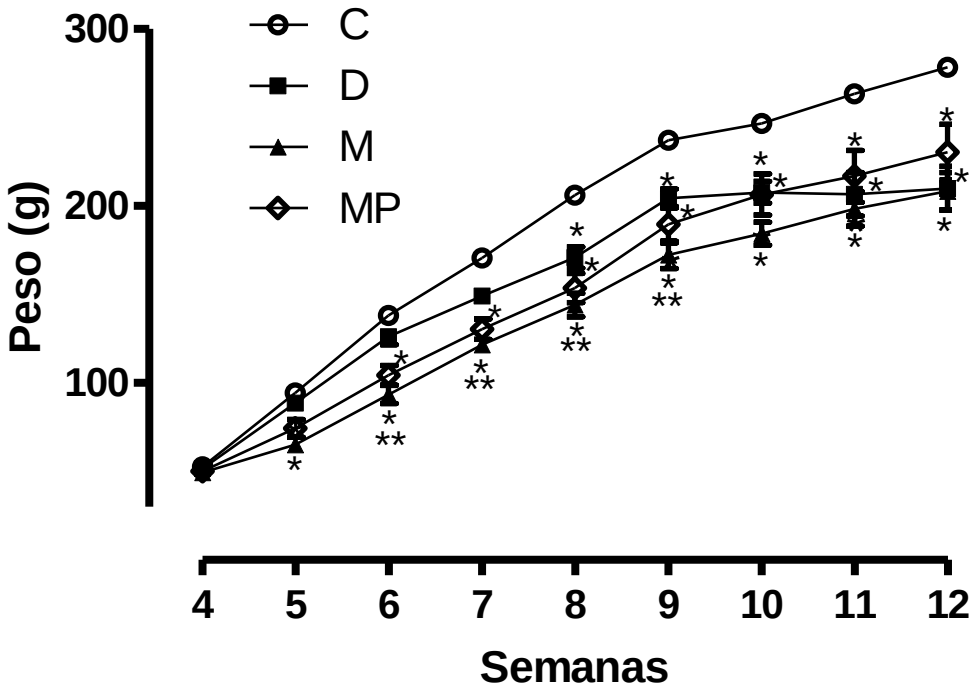
O índice de Lee, que é uma medida análoga ao índice de massa corporal (IMC) em humanos e estimado a partir do peso e comprimento naso-anal do animal, também foi utilizado como parâmetro do desenvolvimento do animal. Como se pode observar na figura 4, não houve diferença estatística entre os grupos.

TABELA 2: Efeito do tratamento com melatonina e sua associação com a pioglitazona sobre o consumo de água e ração, perfil lipídico e peso das estruturas sexuais.

Grupos	C	D	M	MP
Consumo de ração (g/24h)	17,5 ± 0,62	30,0 ± 1,38*	16,5 ± 1,16#	17,8 ± 1,47#
Consumo de água (ml/24h)	29,8 ± 3,78	83,5 ± 7,16*	32,1 ± 2,62#	30,1 ± 1,75#
TAG (mg/dl)	55,7 ± 5,69	65,5 ± 12,17	89,7 ± 17,40	78,3 ± 11,96
AGL (mmol/l)	0,44 ± 0,02	0,35 ± 0,06	0,45 ± 0,05	0,58 ± 0,06#
HDLc (mg/dl)	24,5 ± 1,76	24,7 ± 1,13	24,7 ± 1,69	22,3 ± 1,17
Colesterol (mg/dl)	26,8 ± 1,94	27,7 ± 3,70	34,1 ± 2,83	25,8 ± 1,06
Testículo D (g)	1,6 ± 0,05	1,3 ± 0,07*	0,7 ± 0,12*,#	0,9 ± 0,20*,#
Testículo E (g)	1,6 ± 0,05	1,3 ± 0,07*	0,7 ± 0,12*,#	0,9 ± 0,19*,#
Vesículas seminíferas (g)	0,78 ± 0,07	0,45 ± 0,04*	0,11 ± 0,04*,#	0,11 ± 0,02*,#
Epidídimos (g)	1,57 ± 0,04	0,88 ± 0,10*	0,50 ± 0,10*,#	0,72 ± 0,25*
Canais deferentes (g)	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,01*	0,07 ± 0,01*,#	0,08 ± 0,01*

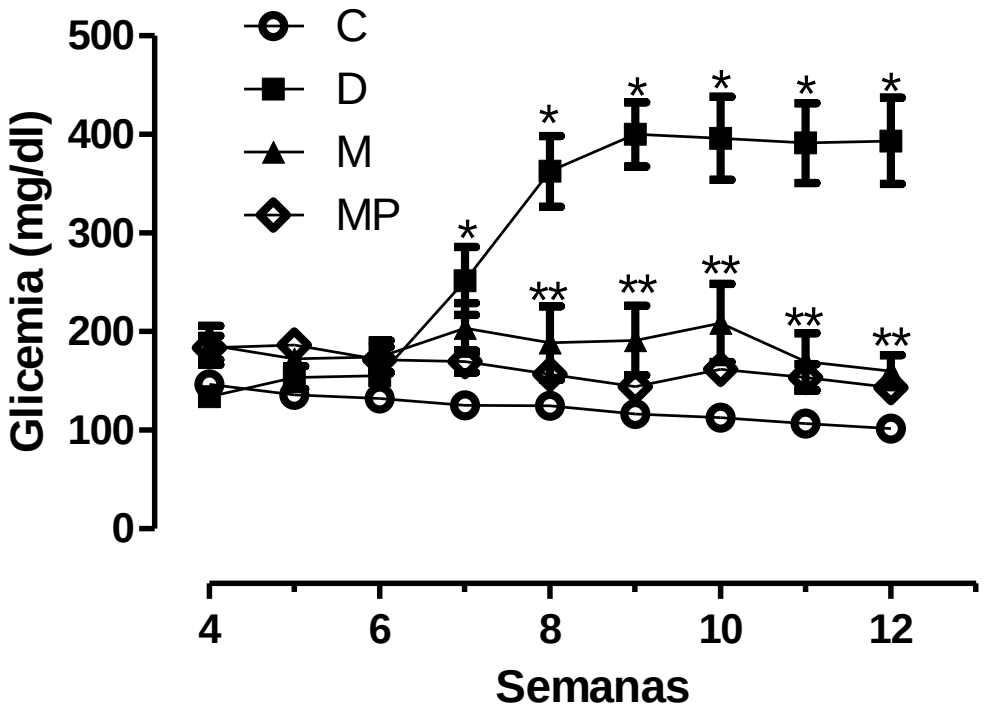
Os dados são apresentados como média ± EPM, n = 6 a 7. O consumo de água e ração representa o consumo durante a última semana. TAG (triacilglicerol), AGL (ácidos graxos livres), HDLc (high density lipoprotein cholesterol) and colesterol total foram dosados no soro dos animais em jejum por 12 horas. * Significativamente diferente do grupo controle. #Significativamente diferente do grupo diabético ($p < 0,05$). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey. Grupo M, ratos diabéticos tratados com melatonina. Grupo MP, ratos diabéticos tratados com melatonina associada com pioglitazona.

Figura 2 - Evolução do peso corporal dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



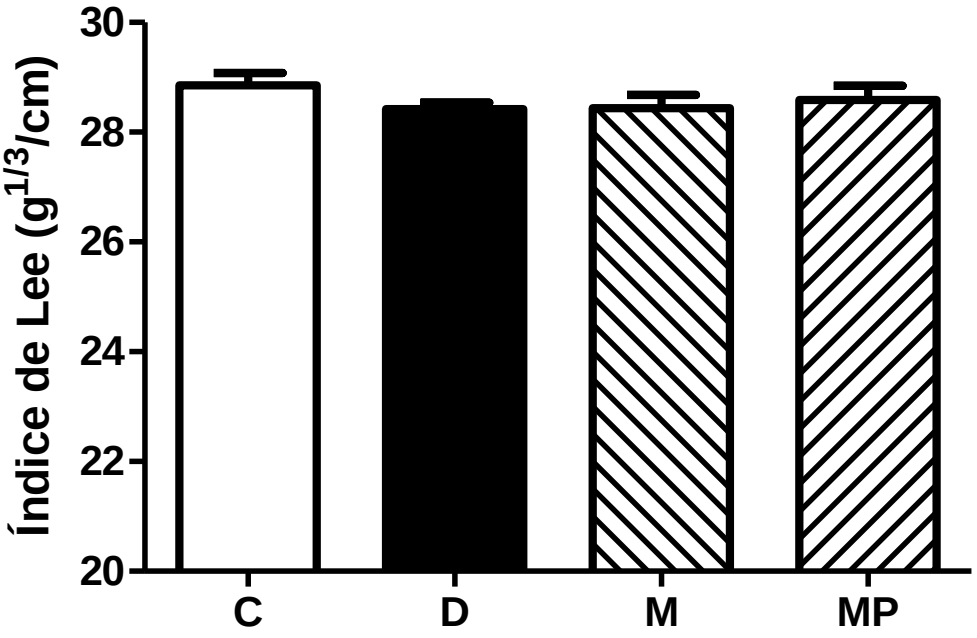
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA Two-way com medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 3 - Evolução da glicemia semanal, medida no sangue da calda dos animais alimentados não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA Two-way com medidas repetidas seguido do teste de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 4 - Índice de Lee de animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

4.2 Teste oral de tolerância à glicose (GTT v.o.)

A curva glicêmica durante o GTT v.o. dos animais diabéticos (grupo D) foi significativamente maior ($p < 0,05$) que a dos animais do grupo C a partir de 15 minutos após a ingestão de glicose por gavagem. A tolerância prejudicada à glicose dos animais diabéticos foi melhorada nos grupos M e MP. A área sob a curva (AUC) dos grupos M e MP foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a do grupo D (figura 5).

4.3 Teste intravenoso de tolerância à insulina (ITT i.v.)

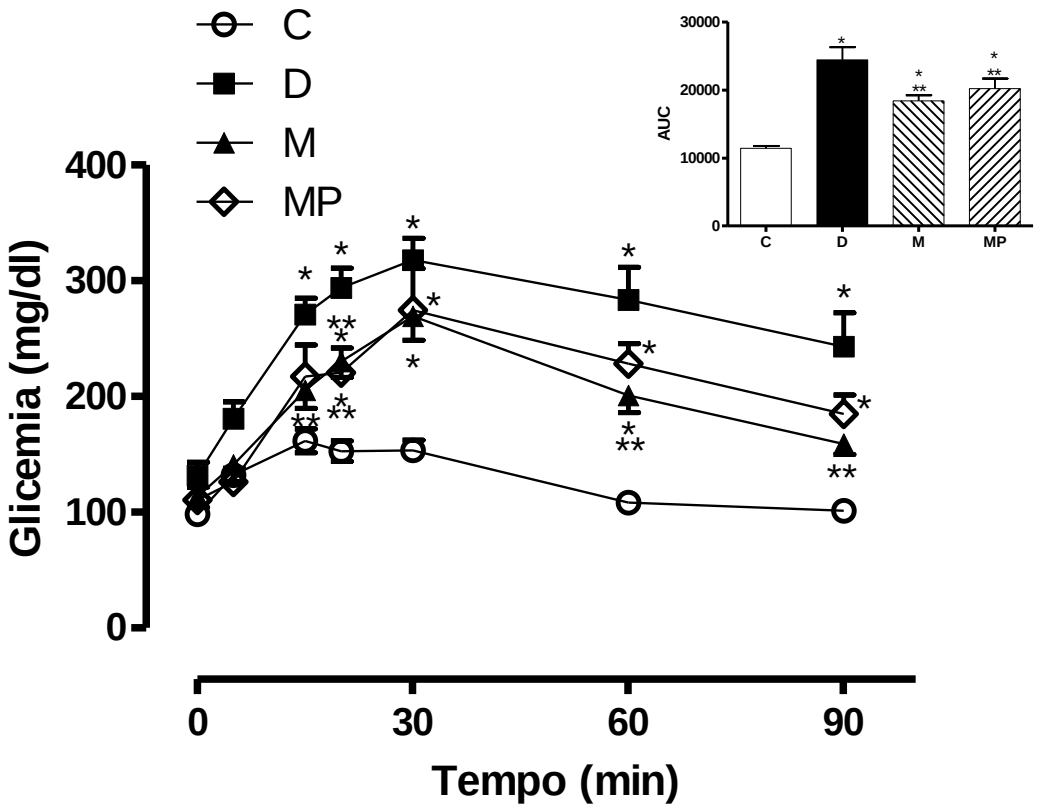
A figura 6 mostra o decaimento da glicemia durante o ITT i.v.. A constante de desaparecimento da glicose (K_{ITT}), calculada como previamente descrito (Bonora et al. 1989), foi significantemente maior nos grupos M e MP em relação ao grupo D e semelhante ao grupo C.

4.4 Efeito do tratamento na massa adiposa e a celularidade dos coxins SC, PE e RP

Animais diabéticos não tratados (grupo D) apresentaram significante redução ($p < 0,05$) no peso dos coxins SC, RP e PE, bem como nos respectivos diâmetros dos adipócitos. O tratamento com melatonina não recuperou o peso dos coxins, porém a associação com pioglitazona aumentou a massa adiposa e a porcentagem de gordura corporal (calculada a partir do somatório dos 3 coxins em relação ao peso corporal) somente no tecido SC. A associação da melatonina com pioglitazona aumentou parcialmente o diâmetro dos adipócitos dos 3 coxins e o tratamento somente com melatonina recuperou parcialmente o diâmetro do adipócito SC, mas não do RP e PE (figura 7, 8 e 9).

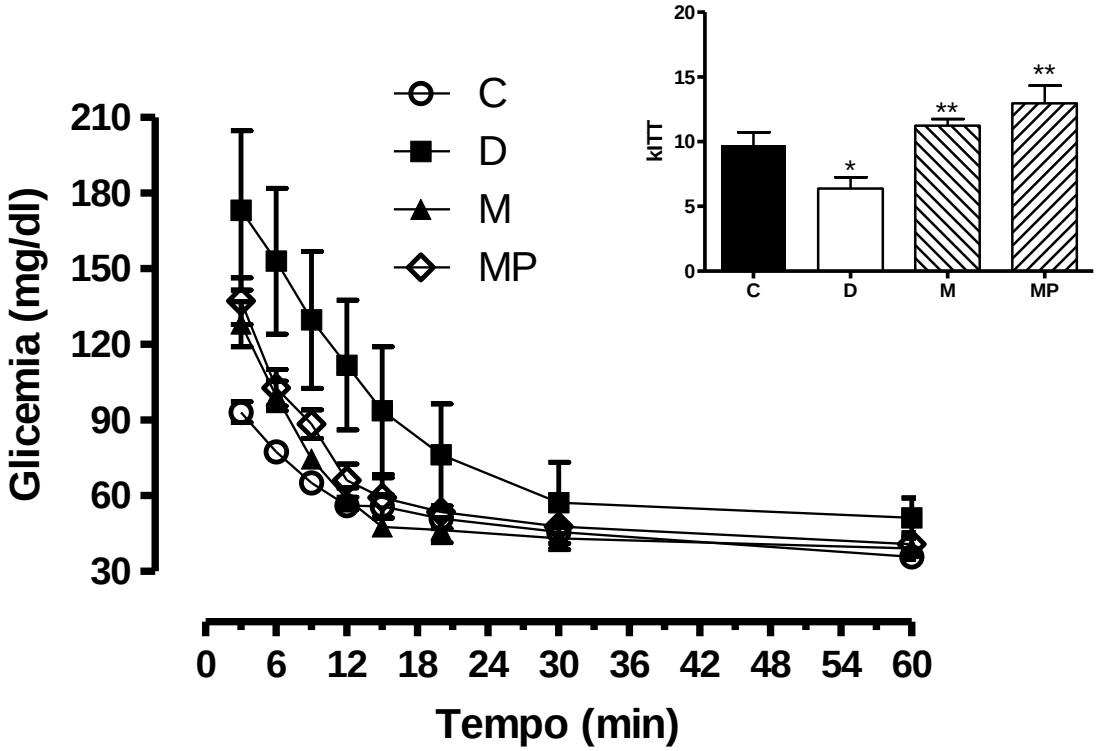
O tratamento com melatonina ou sua associação com pioglitazona não foi capaz de alterar a redução na celularidade apresentada nos animais diabéticos no coxim PE. Nos coxins SC e RP não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 10).

Figura 5 - Evolução da glicemia durante o teste oral de tolerância à glicose (GTTv.o.) dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



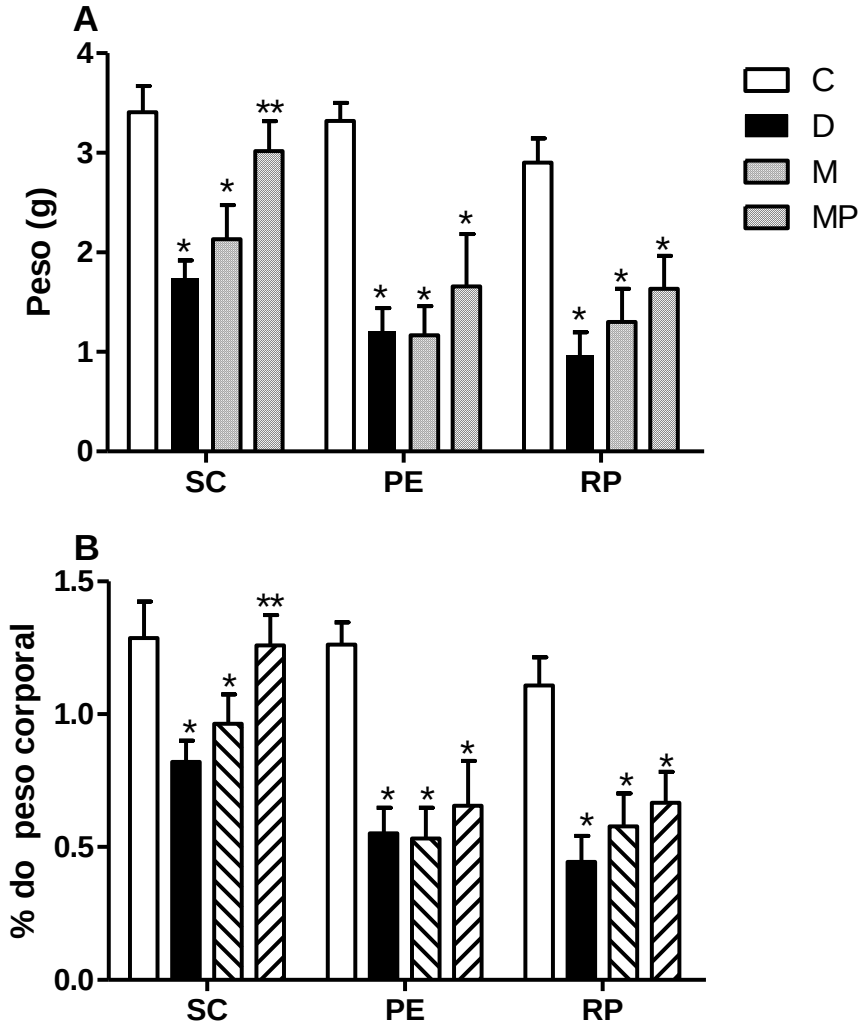
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). Acima da figura está representando a área incremental sob a curva. O teste foi realizado na 10ª semana de vida. *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA Two-way com medidas repetidas seguido do teste de Bonferoni e ANOVA One-way seguido do teste de Tukey para AUC.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 6 - Decaimento da glicemia durante o teste intravenoso de tolerância à insulina ITTi.v. dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



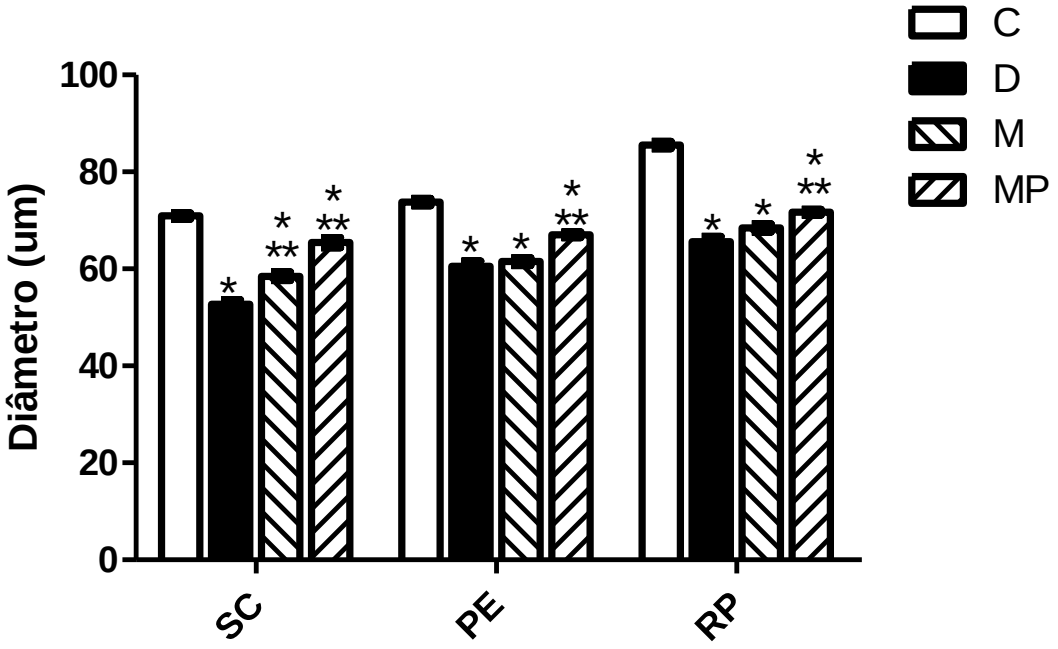
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). Acima da figura está representando a constante de decaimento (K_{ITT}). O teste foi realizado na 10ª semana de vida. *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA Two-way com medidas repetidas seguido de Bonferoni e ANOVA One-way seguido do teste de Tukey para K_{ITT}.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 7 - Efeito do tratamento sobre (A) peso e (B) porcentagem em relação ao peso corporal dos coxins adiposos subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



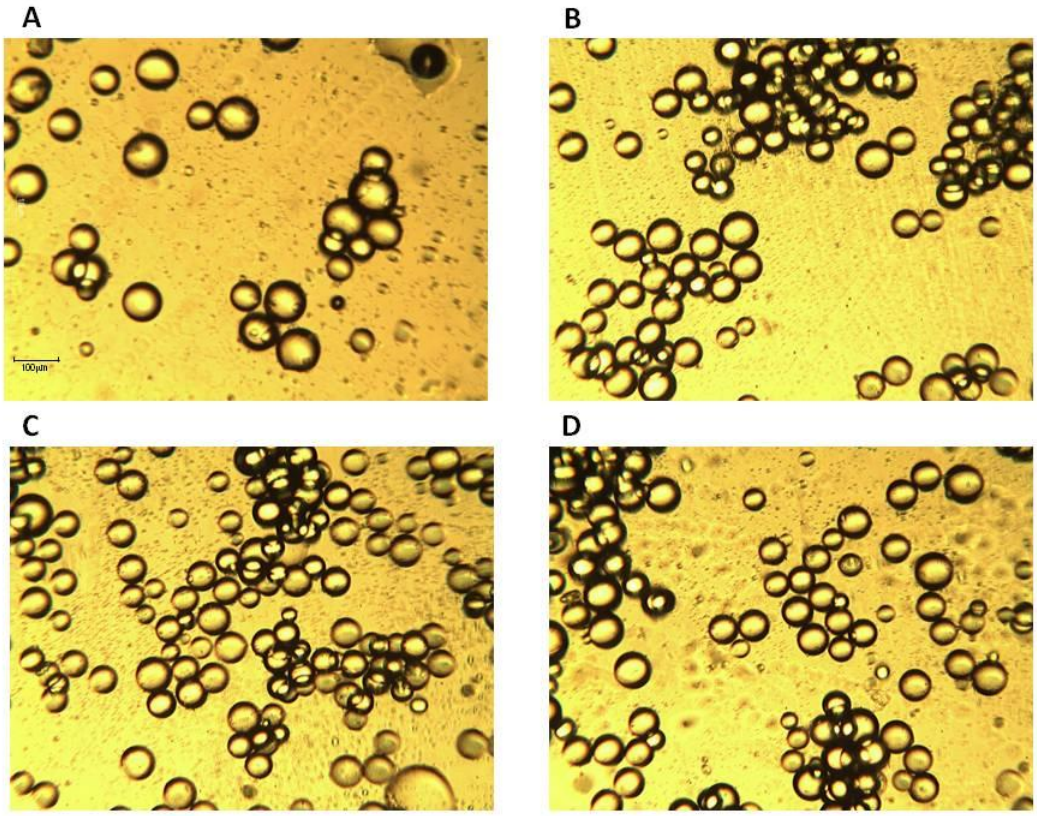
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 8 - Diâmetro dos adipócitos dos tecidos periepididimal (PE), retroperitoneal (RP) e subcutâneo (SC) dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



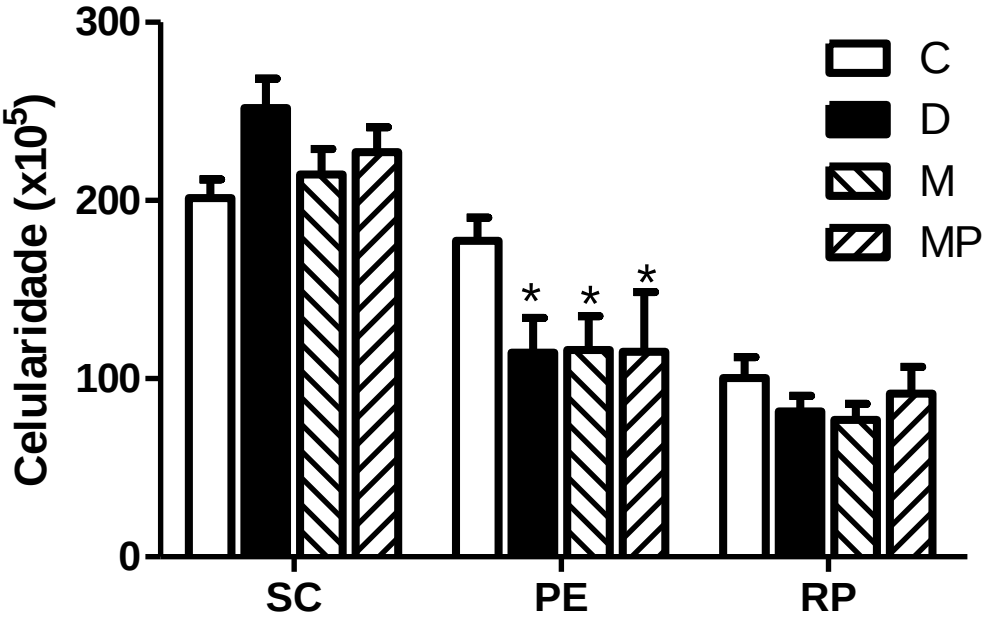
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 9 - Foto ilustrativa dos adipócitos isolados do tecido adiposo PE.



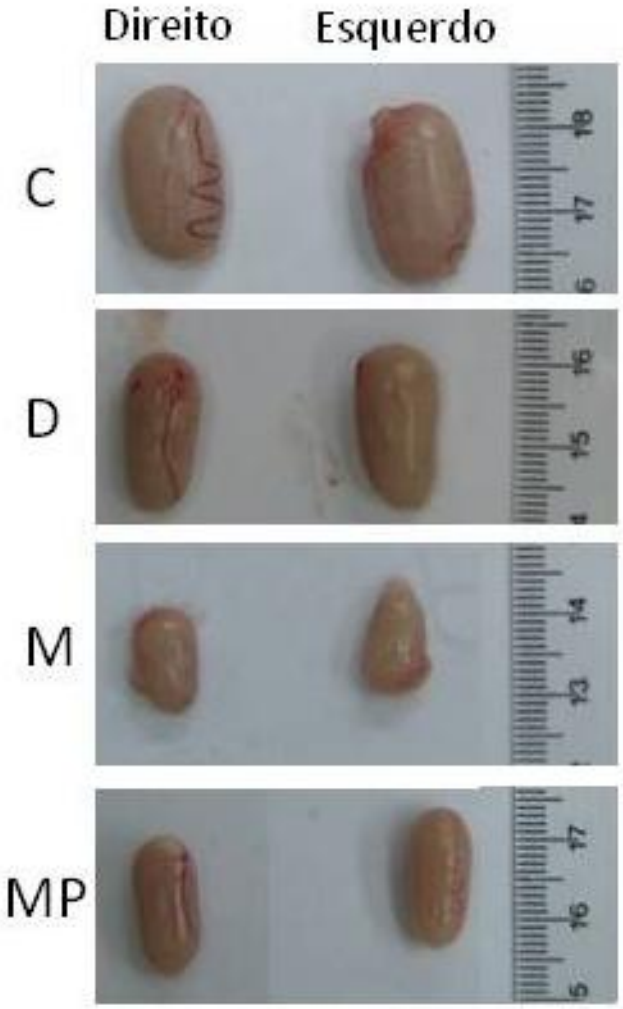
Ratos não diabéticos (painel A), diabéticos não tratados (painel B), e diabéticos tratados com melatonina (painel C) ou melatonina associada com pioglitazona (painel D).
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 10 - Celularidade dos tecidos subcutâneo (SC), periepididimal (PE), retroperitoneal (RP) dos animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D), diabéticos tratados com melatonina (M) ou com melatonina associada com pioglitazona (MP) desde o desmame até a 12ª semana.



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 11 - Foto ilustrativa dos testículos (direito e esquerdo) de ratos não diabéticos (C), diabéticos não tratados (D), e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazona (MP).



Fonte: Oliveira (2012).

4.5 Efeito do tratamento sobre o desenvolvimento sexual

Os animais diabéticos apresentaram menor peso úmido das estruturas sexuais (testículos, epidídimos, canais deferentes e vesículas seminíferas) menores que os animais do grupo C. O tratamento com melatonina, seja sozinha seja associada com a pioglitazona, parece ter causado uma interrupção no desenvolvimento puberal dessas estruturas, deixando-as menor que as do grupo D (Tabela 2 e Figura 11).

4.6 Efeito do tratamento nos níveis plasmáticos de adiponectina, insulina, glicemia e outras dosagens plasmáticas

O soro dos ratos em jejum de 12 horas foi usado para as análises bioquímicas. Os ratos diabéticos (grupo D) apresentaram maior nível de glicemia em jejum e de frutosamina e reduzido nível de adiponectina em relação ao grupo C. O tratamento com melatonina foi capaz de manter esses valores para níveis semelhantes ao grupo C (Figura 12). O grupo MP não apresentou incremento no efeito da melatonina.

O tratamento com melatonina e a associação com pioglitazona não alterou a hipoinsulinemia causada pela injeção neonatal de STZ, no entanto o HOMAir foi significativamente menor nos grupos M e MP quando comparado com o grupo D (figura 12).

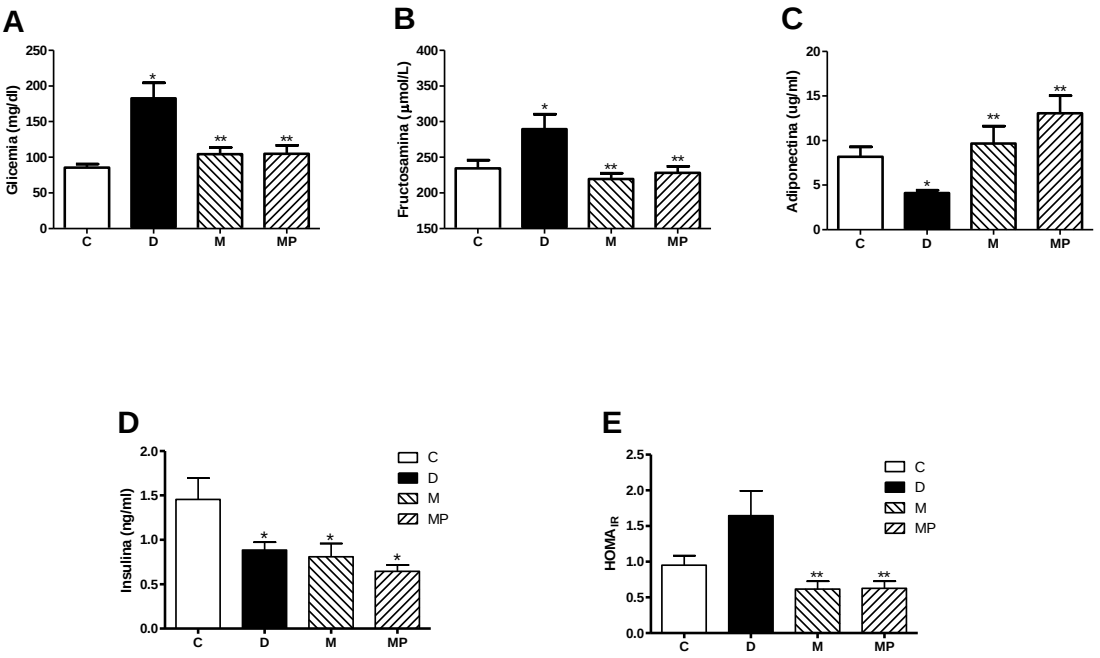
Os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa na concentração plasmática de testosterona e leptina que não foi alterado pelo tratamento com melatonina associada ou não com a pioglitazona (Figura 13). Na figura 13C, podemos observar uma correlação positiva ($p < 0,01$) entre o somatório dos 3 coxins adiposos e a leptinemia.

Não foi encontrado diferença estatística nos níveis plasmáticos de triacilglicerol (TAG), HDLc e colesterol total entre os grupos. Nos níveis de ácidos graxos livres (AGL), somente o grupo MP apresentou níveis estatisticamente maior que o grupo D (Tabela 2).

4.7 Secreção estática de insulina pela ilhota pancreática isolada

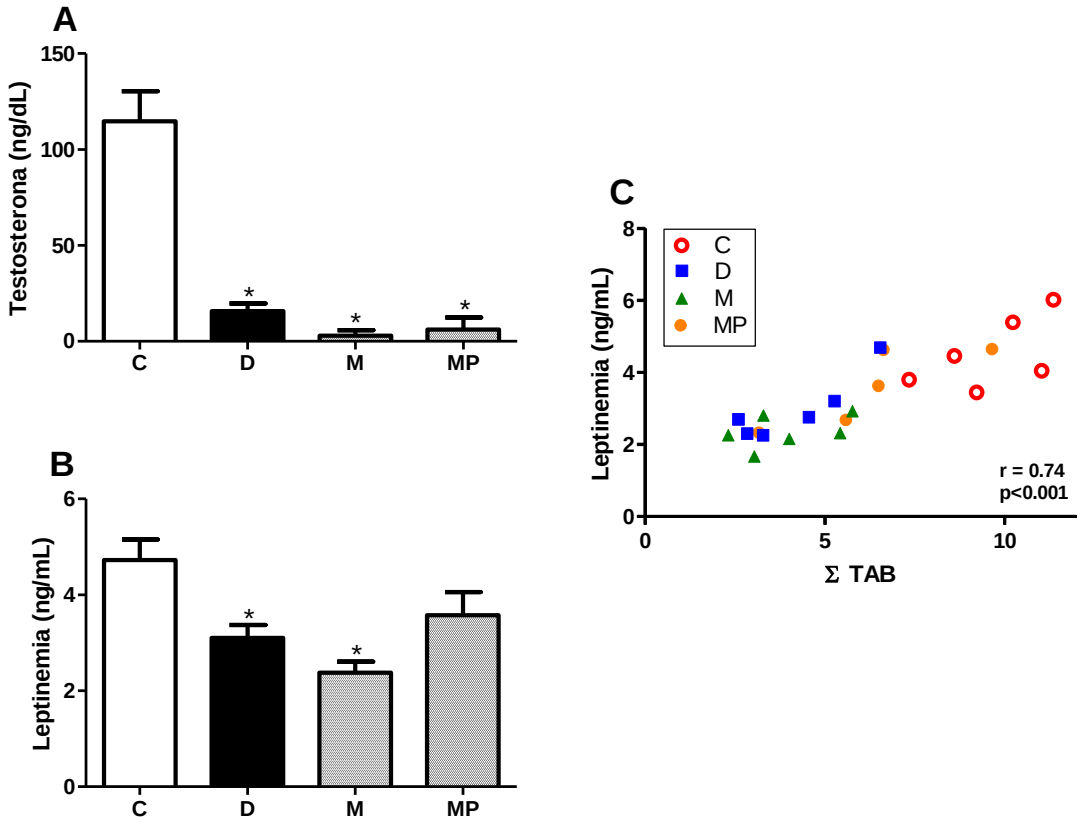
As ilhotas dos animais do grupo D apresentaram uma menor capacidade de secreção de insulina estimulada por glicose (5,6 e 16,7mM) que o grupo C ($p<0,05$). O tratamento a longo prazo com melatonina e a associação com pioglitazona não recuperou esse defeito funcional causado pela STZ na célula B pancreática (figura 14). O mesmo foi observado no modelo do HOMA 1-% B, que estima a função da célula β pancreática baseado na insulina e glicemia de jejum.

Figura 12 - Dosagens plasmáticas de glicemia (painel A), Frutosamina (painel B) Adiponectina (painel C), insulina (painel D) e $Homa_{IR}$ (painel E) de animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazona (MP) em jejum de 12 horas.



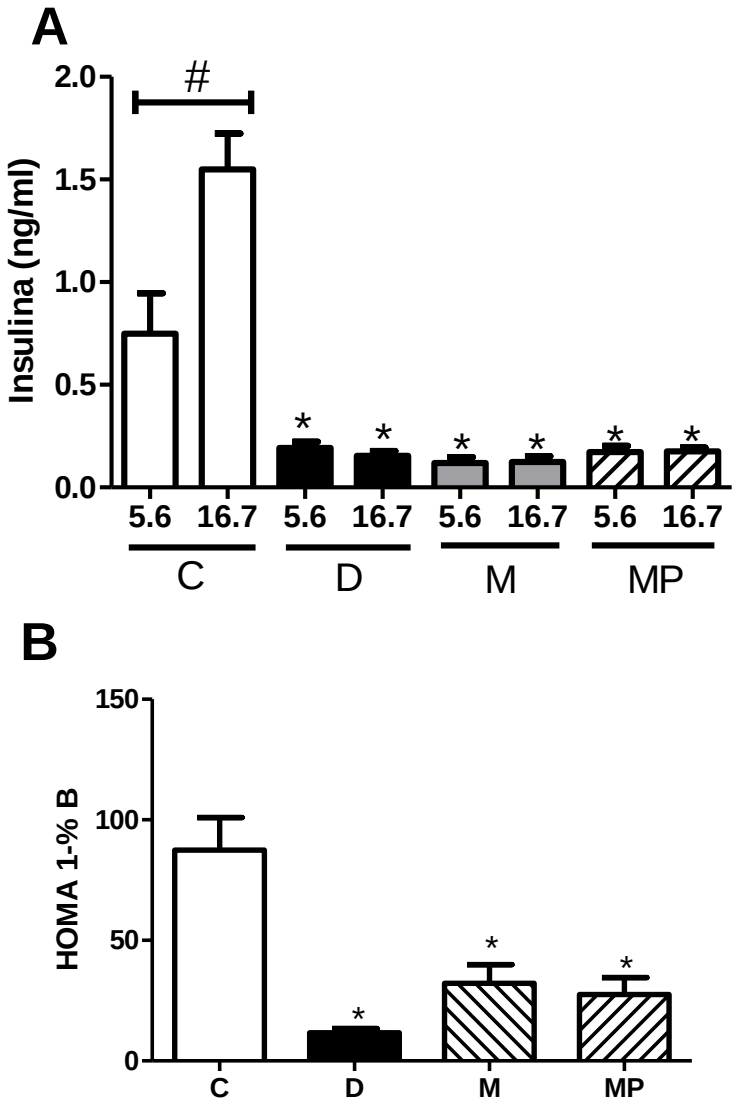
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle ($p<0,05$); **Estatisticamente diferente do grupo diabético ($p<0,05$). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 13 - Dosagens plasmáticas de testosterona (painel A) e leptina (painel B) de animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazona (MP) em jejum de 12 horas. O painel C mostra a correlação entre a leptinemia e o somatório dos 3 coxins adiposos (SC, PE e RP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (p<0,05); **Estatisticamente diferente do grupo diabético (p<0,05). ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 14 - Efeito do tratamento de animais diabéticos com melatonina sozinha ou associada com pioglitazona na secreção de insulina pela ilhota pancreática isolada em meio com 5,6mM ou 16,7mM de glicose (painel A) e na estimativa da função da célula β pancreática pelo modelo do HOMA 1-% B (painel B).



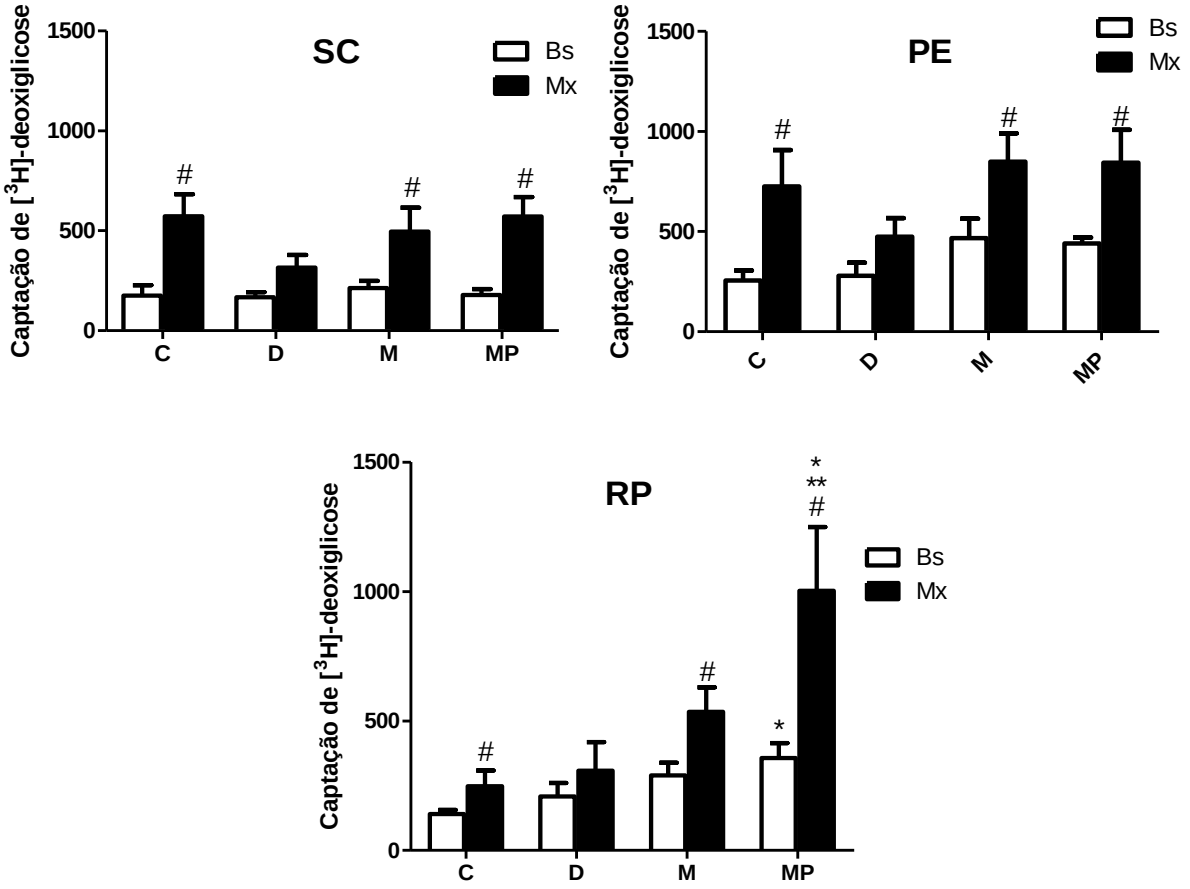
No painel A, as ilhotas foram isoladas e incubadas na presença de glicose por 1 hora. Após esse tempo, foi dosada a insulina no meio de incubação (n = 4 animais por grupo). No painel B, o HOMA 1-% B foi calculado a partir da fórmula: HOMA 1-% B = [Insulina em jejum (μU/mL) x 20] / [Glicemia em jejum (mmol/L) – 3,5] (n = 6 a 7 animais por grupo). Valores expressos como média ± E.P.M.. * Estatisticamente diferente do grupo controle. # Estatisticamente diferente entre 5,6 e 16,7mM de glicose ($p<0,05$).
Fonte: Oliveira (2012).

4.8 Ensaios biológicos

4.8.1 Teste de captação de [^{3}H]-2-Desoxi-D-Glicose ([3H]-2DG) em adipócitos isolados

Como observado nas figuras 15, não houve diferença estatística entre a capacidade basal e a máxima de captação de [^{3}H]-2DG dos adipócitos dos 3 coxins (SC, PE e RP) nos animais do grupo D, porém, os adipócitos dos animais diabéticos tratados com melatonina associada ou não com pioglitazona apresentaram essa diferença significante ($p < 0,05$) entre o basal (Bs) e estimulado com insulina (Mx) demonstrando uma melhor responsividade dos adipócitos destes animais à insulina. Além disso, não houve diferenças entre os basais, nem entre os máximos, dos coxins PE e SC, entre os grupos. Entretanto, somente os adipócitos do coxim RP, dos animais foram tratados com a associação de melatonina com a pioglitazona, apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da captação de [^{3}H]-2DG tanto basal (em ralação ao grupo C) quanto maximamente estimulada com insulina (em relação ao grupo C e D) (Figura 15).

Figura 15 - Captação de [^{3}H]-2DG basal (Bs) e maximamente estimulado com 10nM de insulina (Mx) em adipócitos isolados dos coxins subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) de animais não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou associação de melatonina com pioglitazona (MP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais). *Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo C (p<0,05). **Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo D (p<0,05). #Estatisticamente diferente do basal do respectivo grupo (p<0,05). Teste ANOVA Two-way com medida repetida seguido do teste de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

4.8.2 Teste de Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em Lipídeos e Oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose até $^{14}CO_2$ em Adipócitos Isolados

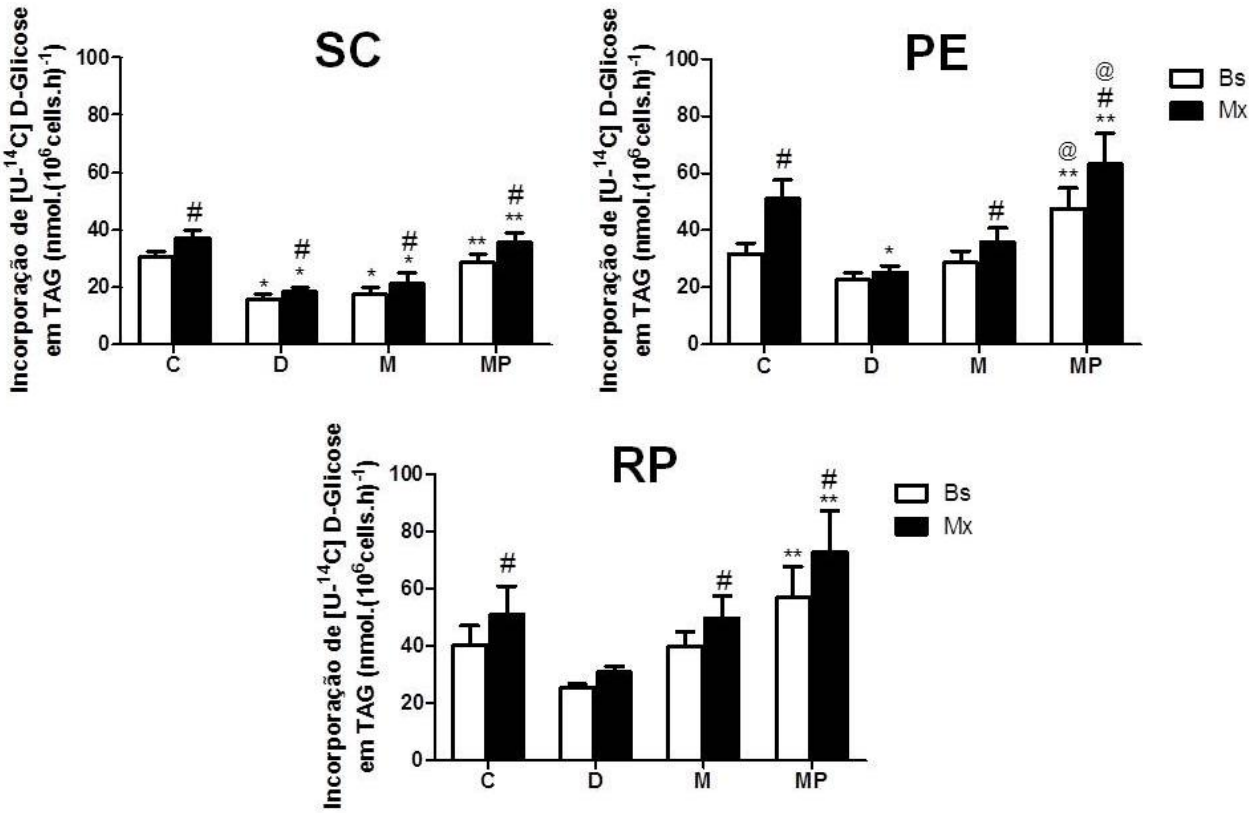
O tecido adiposo subcutâneo dos animais diabéticos tratados ou não com melatonina apresentou menor capacidade de incorporar D-[U-^{14}C]-Glicose em TAG tanto basal (Bs) como maximamente estimulado pela insulina (Mx) quando comparada ao grupo C. Entretanto, o tecido SC dos animais diabéticos tratados com melatonina associada com pioglitazona apresentou as capacidades basal e máxima de incorporar glicose em TAG significativamente maior ($p < 0,05$) que a dos diabéticos não tratados e semelhante às do controle (Figura 16). Já na fração de glicose que foi convertida em [^{14}C]-CO_2 (oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose) não houve diferenças significativas entre os grupos entre os valores basais nem entre os máximos (Figura 17) nesse coxim.

As células do tecido adiposo PE dos animais diabéticos também apresentaram menor capacidade máxima de incorporação de glicose em TAG quando comparadas com o grupo C, além de não apresentar diferença estatística entre o basal e o máximo. Os adipócitos do tecido PE dos animais que foram tratados a longo prazo com melatonina apresentaram maior incorporação de glicose em TAG quando estimulada maximamente com insulina, passando a ser estatisticamente diferente ($p < 0,05$) da incorporação basal. Quando associada com a pioglitazona, a melatonina aumentou a incorporação de glicose em TAG, tanto basal quanto máxima, quando comparada com o grupo D e M, além de apresentar diferença estatística ($p < 0,05$) entre a incorporação basal e máxima (Figura 16). No teste de oxidação de glicose até CO_2, a resposta aos tratamentos foi semelhante ao teste de incorporação de glicose em TAG, porém a capacidade máxima de oxidação dos animais tratados com melatonina (grupo M) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a dos animais do grupo D (figura 17). A capacidade máxima do grupo MP foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a do grupo M, enquanto que a capacidade basal foi significativamente ($p < 0,05$) maior que a basal do grupo D.

No tecido adiposo RP dos animais do grupo D, houve uma redução, porém não significativa, na capacidade basal e máxima de incorporar D-[U-^{14}C]-Glicose em TAG em relação ao controle. Entretando, a diferença estatística entre o basal e o máximo que se apresentou no grupo C não ocorreu nos animais diabéticos sem

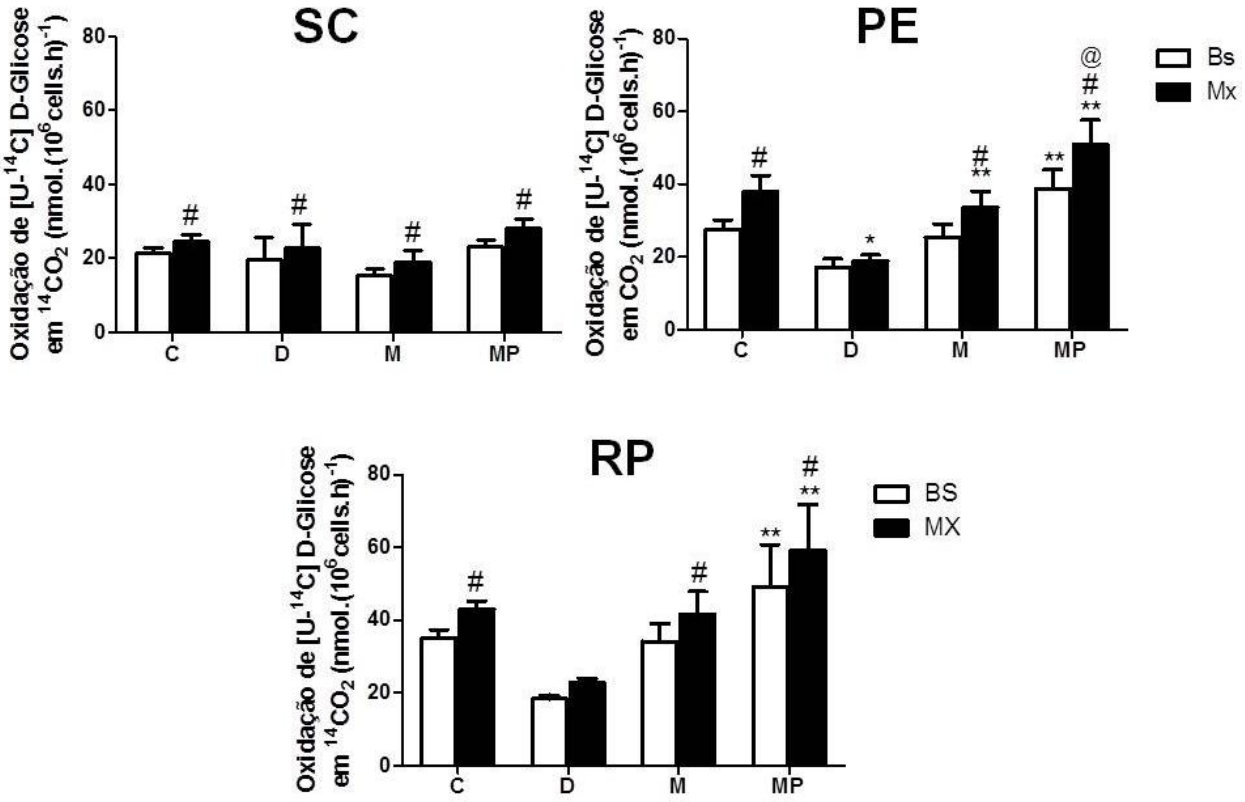
tratamento (grupo D). Já nos animais tratados com melatonina, observou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre o basal e o máximo. Quando associada com a pioglitazona, a melatonina aumentou a capacidade basal e máxima de incorporação, passando a ser estatisticamente diferente das do grupo D (Figura 16). Resposta semelhante ao que ocorreu na incorporação em TAG foi encontrada em relação à capacidade de oxidar D-[U-^{14}C]-Glicose em $^{14}CO_2$ (Figura 17).

Figura 16 - Incorporação de D-[U-^{14}C]-Glicose em triacilglicerol (TAG) basal (Bs) e maximamente estimulado com insulina (Mx) em adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) de ratos não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazina (MP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). * Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo C (p<0,05). ** Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo D (p<0,05). #Estatisticamente diferente do basal do respectivo grupo (p<0,05). @Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo M (p<0,05). Teste ANOVA Two-Way com medida repetida seguido do teste de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 17 - Oxidação de D-[U-^{14}C]-Glicose em CO_2 basal (Bs) e maximamente estimulado com insulina (Mx) em adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) de ratos não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazina (MP).



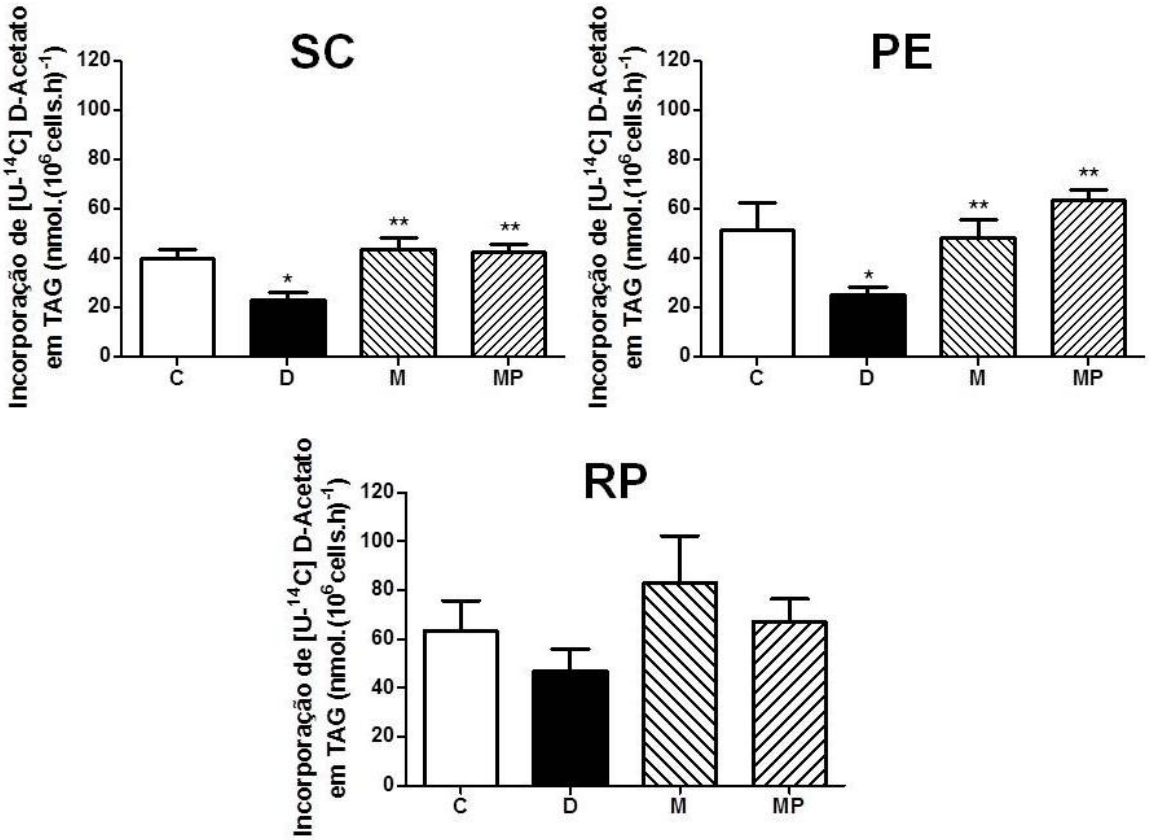
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). * Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo C (p<0,05). ** Estatisticamente diferente do basal ou máximo do grupo D (p<0,05). #Estatisticamente diferente do basal do respectivo grupo (p<0,05). @Estatisticamente diferente do máximo do grupo M (p<0,05). Teste ANOVA Two-Way com medida repetida seguido do teste de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

4.8.3 Teste de Incorporação de [2-^{14}C]-Acetato em Lipídeos e Oxidação [2-^{14}C]-Acetato até $^{14}CO_2$ em Adipócitos Isolados

As figuras 18 e 19 mostram que, quando o substrato foi o [2-^{14}C]-Acetato, os tratamentos (grupo M e MP) foram eficazes em manter a capacidade de incorporá-lo em TAG semelhante ao grupo controle e estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do grupo D nos coxins SC e PE. Na capacidade de oxidá-lo a [^{14}C]-CO_2, os adipócitos do coxim PE dos animais diabéticos tratados com melatonina ou melatonina associada com pioglitazona apresentaram uma resposta que não foi significativamente diferente do grupo C e D. Nos adipócitos do coxim SC dos animais diabéticos com ou sem tratamento apresentaram menos capacidade de oxidar o [2-^{14}C]-Acetato em relação ao grupo C. Ambas as capacidades apresentaram-se estatisticamente menores ($p < 0,05$) nos animais diabéticos sem tratamento em relação ao grupo C nos coxins SC e PE.

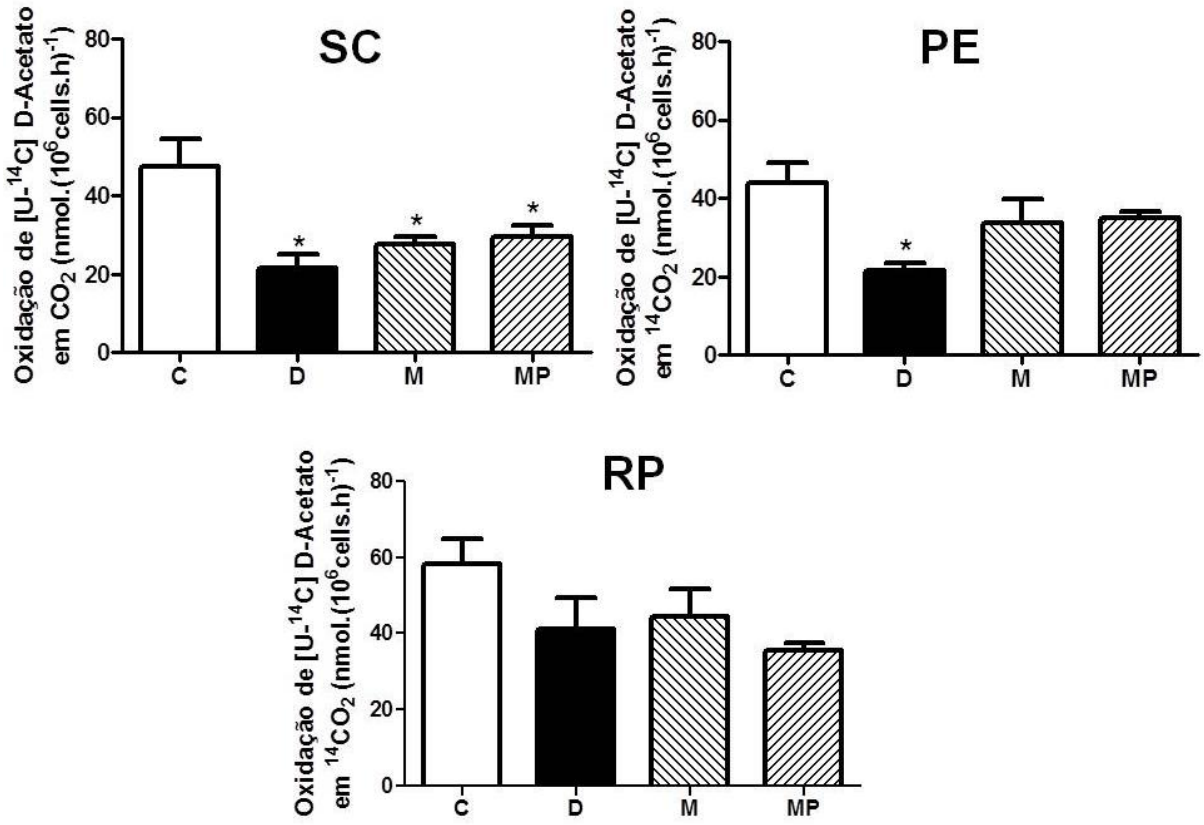
Nos adipócidos do tecido RP não houve diferenças estatísticas entre os grupos na capacidade de incorporá-lo em TAG e na capacidade de oxidá-lo a [^{14}C]-CO_2 (Figuras 18 e 19).

Figura 18 - Incorporação de [2-^{14}C]-Acetato em triacilglicerol (TAG) em adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) de ratos não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazina (MP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). * Estatisticamente diferente do grupo C ($p<0,05$). ** Estatisticamente diferente do grupo D ($p<0,05$). Teste ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 19 - Oxidação de [2-^{14}C]-Acetato em CO_2 em adipócitos isolados do tecido adiposo subcutâneo (SC), periepididimal (PE) e retroperitoneal (RP) de ratos não diabéticos (C), diabéticos sem tratamento (D) e diabéticos tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazina (MP).

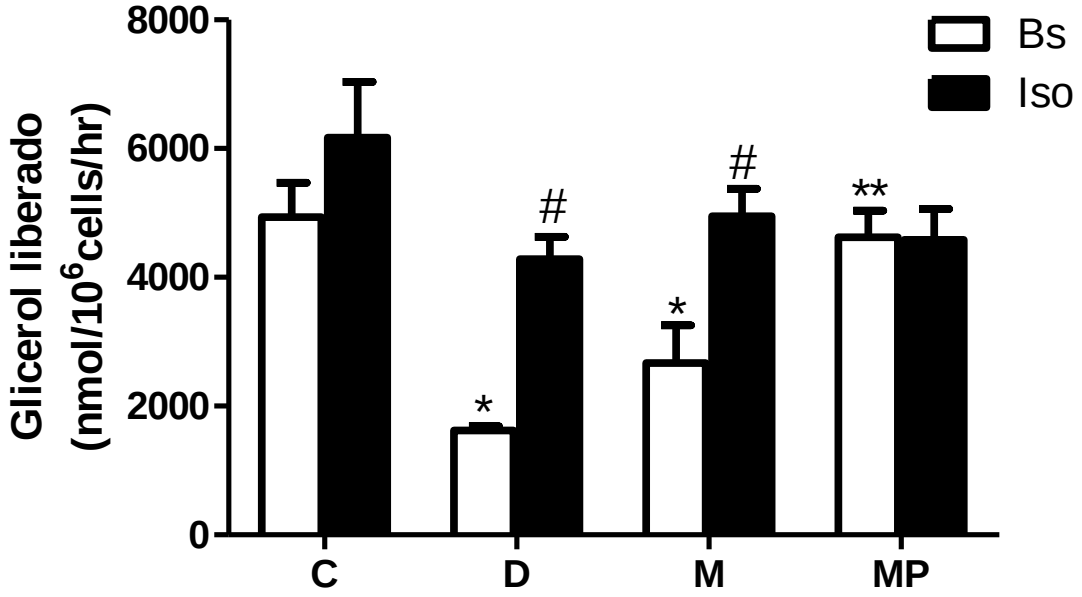


Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). * Estatisticamente diferente do grupo C ($p<0,05$). Teste ANOVA One-Way seguido do teste de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

4.8.4 Teste de Avaliação da Atividade Lipolítica Frente a Estímulo com Isoproterenol

Devido à pequena quantidade de tecido adiposo presente nos animais diabéticos e tratados com melatonina e associada com pioglitazona, só foi possível realizar o teste de lipólise no tecido adiposo PE. Como observado na figura 20, os animais diabéticos apresentaram menor capacidade lipolítica basal que os animais do grupo C. O tratamento com melatonina não foi capaz de recuperar a capacidade basal, mas, quando associada com pioglitazona, a capacidade basal foi completamente revertida, apresentando-se estatisticamente diferente do grupo D e M. Não houve diferença estatística entre as capacidades máximas dos 4 grupos.

Figura 20 - Efeito do tratamento de animais diabéticos com melatonina (M) e associação de melatonina com pioglitazona (MP) sobre a capacidade lipolítica basal (Bs) e maximamente estimulado com isoproterenol (Iso) em adipócitos isolados do tecido adiposo periepididimal (PE).

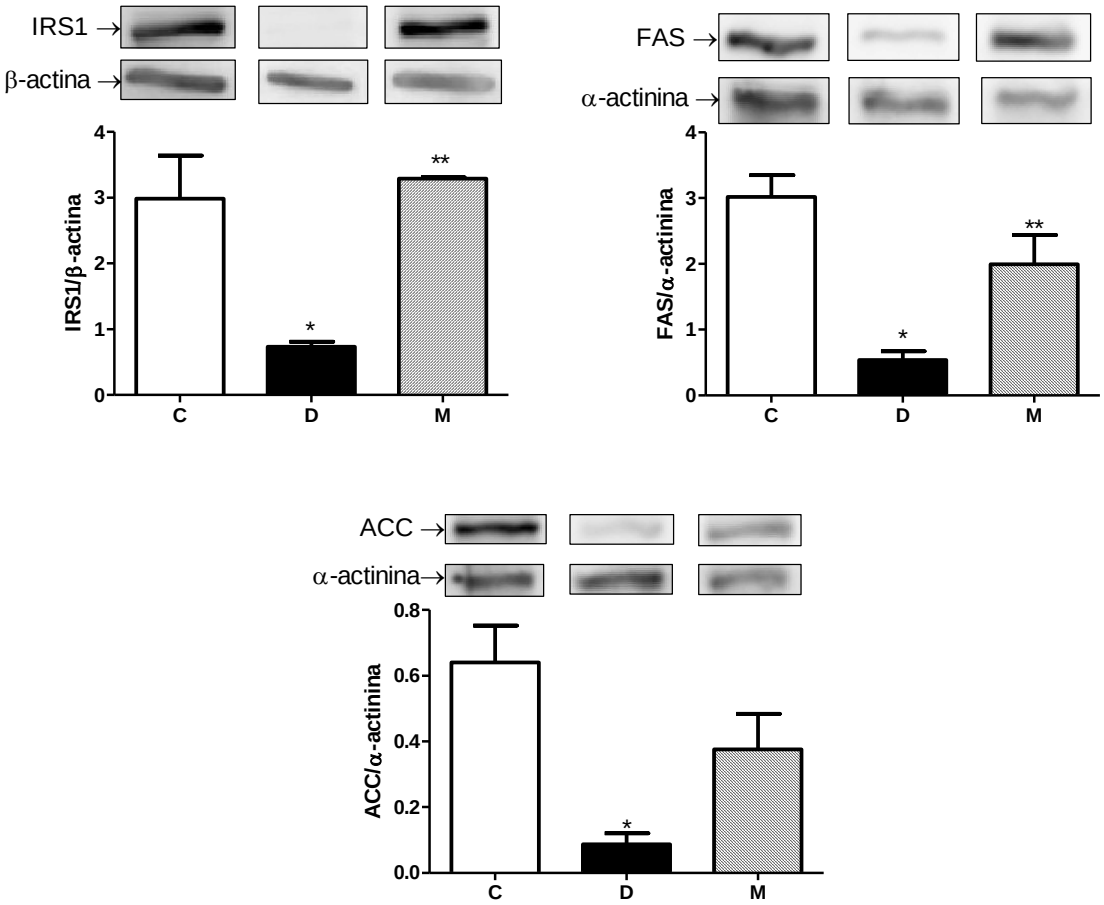


Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 6 a 7 animais por grupo). * Estatisticamente diferente do basal do grupo C (p<0,05). ** Estatisticamente diferente do basal dos grupos D e M (p<0,05). # Estatisticamente diferente do basal do respectivo grupo (p<0,05). Teste ANOVA Two-Way com medida repetida seguido de Bonferroni.
Fonte: Oliveira (2012).

4.9 Expressão de proteína por Western Blotting

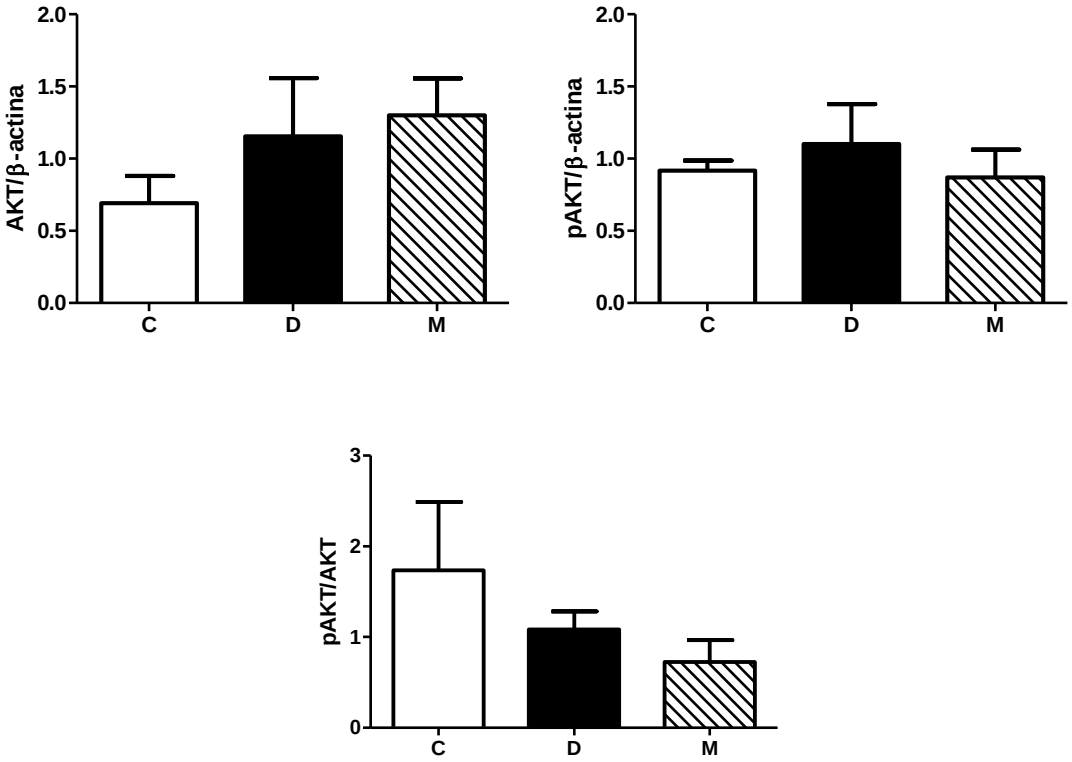
A fim de investigar o mecanismo pelo qual o tecido adiposo dos animais diabéticos apresentou menor capacidade lipogênica e menor responsividade à insulina, foi realizada, em um segundo grupo experimental (n = 3 por grupo), a quantificação da expressão de proteínas envolvidas na lipogênese e na via de sinalização da insulina no tecido periepididimal (PE) dos animais controle (C) e diabéticos sem tratamento (D) ou tratados com melatonina (M). Os animais diabéticos apresentaram uma redução significativa na expressão de ACC, FAS e IRS1. Os animais que foram tratados com melatonina apresentaram expressão de IRS1 e FAS estatisticamente maior ($p < 0,05$) que a do grupo D e a expressão de ACC parcialmente aumentada, uma vez que não foi estatisticamente diferente do grupo D nem do grupo C (figura 21). A expressão de AKT total e da forma fosfotilada (pAKT) não apresentou diferenças entre os grupos, bem como na razão entre a forma fosforilada e a total (figura 22).

Figura 21 - Expressão proteica por western blotting de substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), ácido graxo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (ACC) no tecido adiposo periepididimal (PE) de animais não diabéticos (C) e diabéticos sem tratamento (D) ou tratados com melatonina (M).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 3). *Estatisticamente diferente do grupo C (p<0,05). ** Estatisticamente diferente do grupo D (p<0,05). Teste ANOVA One-Way seguido de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 22 - Expressão proteica por western blotting de AKT total e a forma fosforilada da AKT (pAKT) no tecido adiposo periepididimal (PE) de animais não diabéticos (C) e diabéticos sem tratamento (D) ou tratados com melatonina (M). No painel inferior, a razão entre a pAKT e a AKT total.



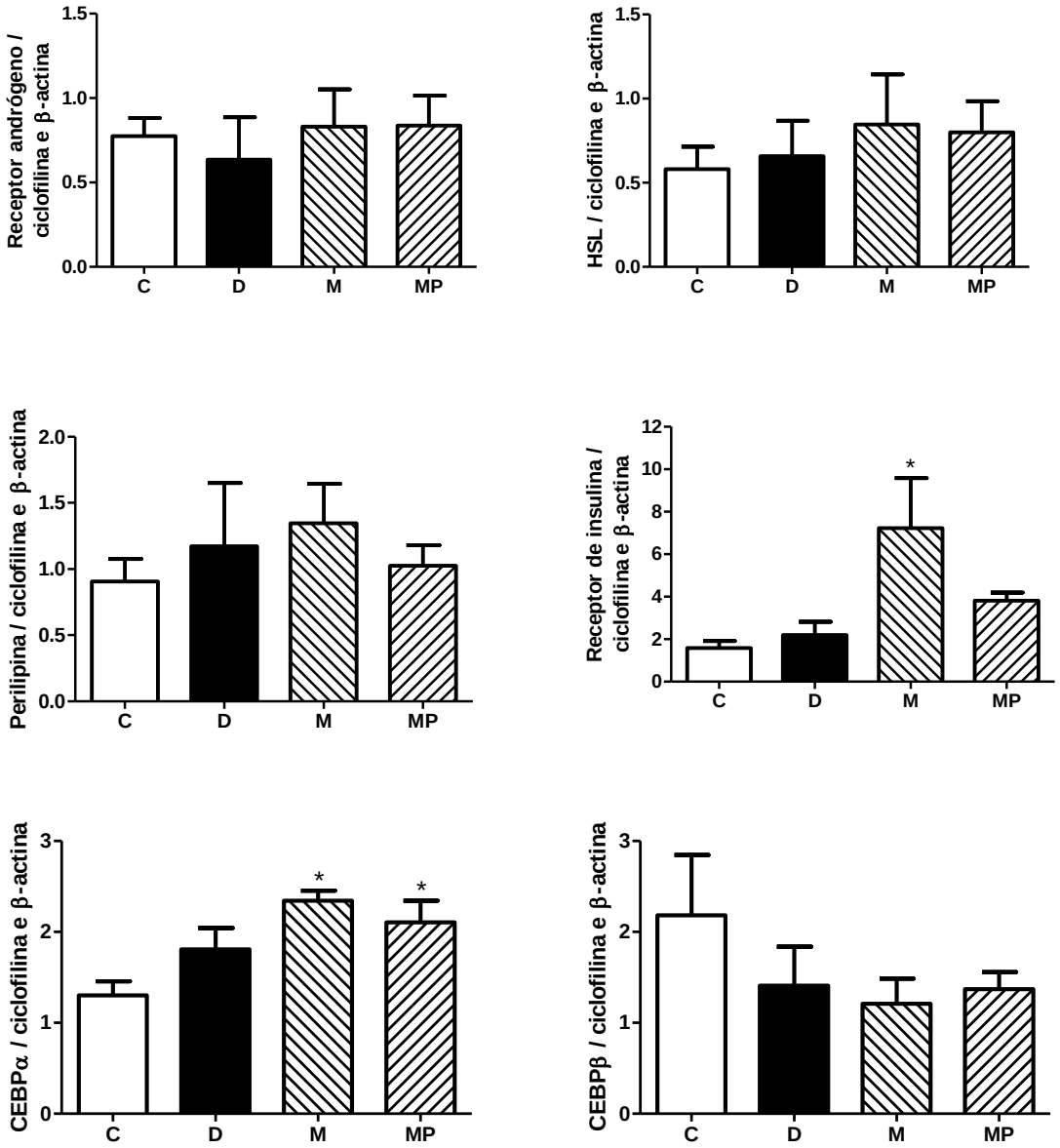
Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 3). Não houve diferença estatística entre os grupos. Teste ANOVA One-Way seguido de Tukey.
Fonte: Oliveira (2012).

4.10 Expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) no tecido periepididimal (PE)

Apesar de os animais diabéticos não apresentarem alteração significativa na expressão dos genes avaliados em relação aos animais não diabéticos, os animais diabéticos tratados com melatonina apresentaram uma expressão significantemente maior ($p<0,05$) de receptor de insulina e C/EBPα em relação ao grupo controle (C) e expressão de FAS significantemente ($p<0,05$) maior que a do grupo diabético (D). Quando associado com pioglitazona, o tratamento com melatonina aumentou significantemente ($p<0,05$) a expressão de C/EBPα e G6PDH em relação ao grupo C. Em relação à expressão de C/EBPβ, pôde-se observar uma redução, embora não estatisticamente diferente, no grupo M e MP em relação ao grupo C (figuras 23 e 24).

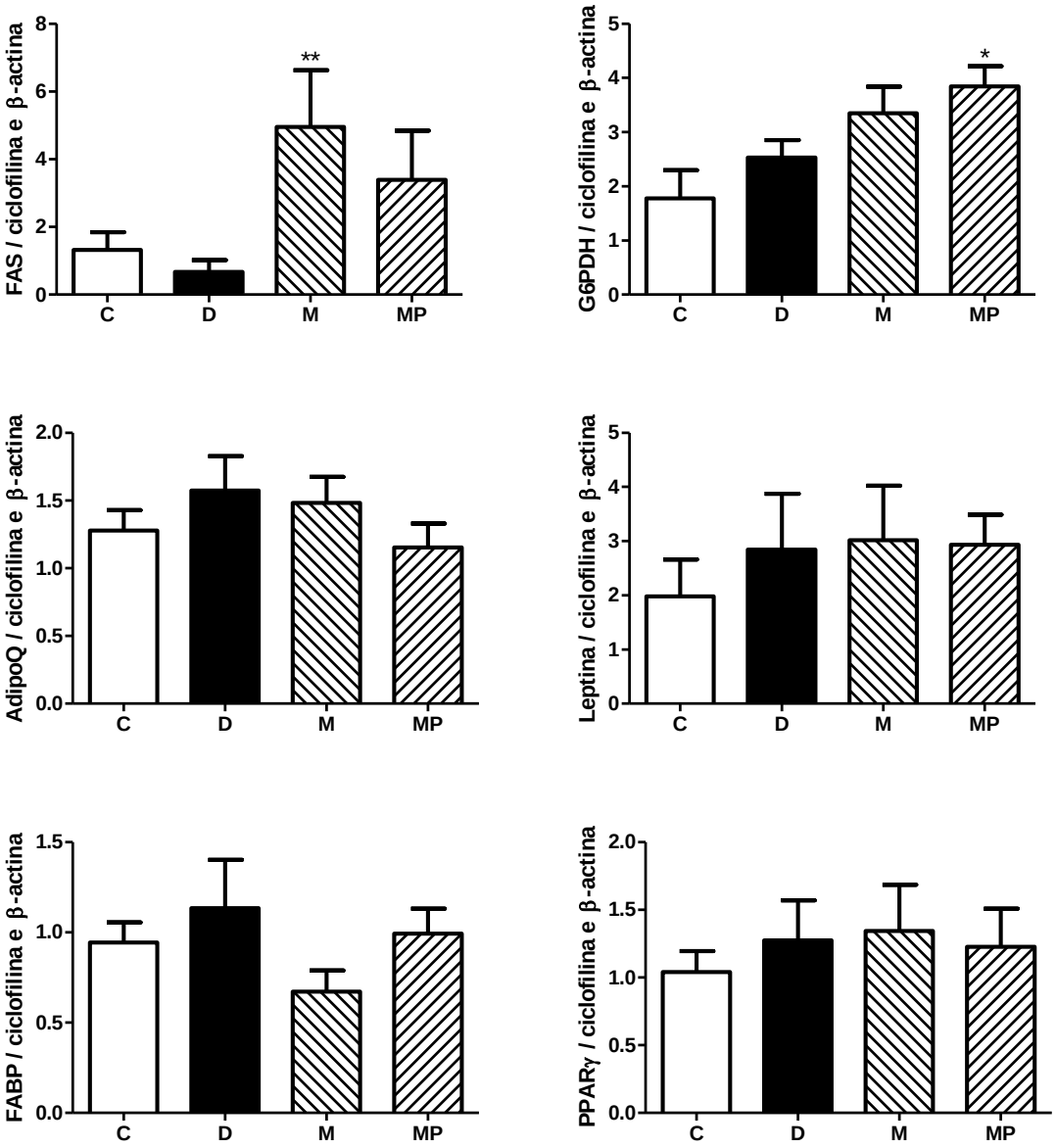
Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na expressão gênica de receptor de andrógeno, HSL, perilipina, adiponectina, leptina, FABP e PPARγ (figuras 23 e 24).

Figura 23 - Expressão gênica por qPCR de Receptor de andrógeno, Lipase Hormônio Sensível (HSL), Perilipina, Receptor de Insulina, C/EBPα e C/EBPβ no tecido adiposo periepididimal (PE) de animais não diabéticos (C) e diabéticos sem tratamento (D) e tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazona (MP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 4 a 5 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo C (p<0,05). Teste ANOVA One-Way seguido de Tukey (n de 4 a 5 animais por grupo).
Fonte: Oliveira (2012).

Figura 24 - Expressão gênica por qPCR de Ácido Graxo Sintase (FAS), Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), Adiponectina (AdipoQ), Leptina, Proteína de ligação de Ácidos Graxos (FABP) e PPARγ no tecido adiposo periepididimal (PE) de animais não diabéticos (C) e diabéticos sem tratamento (D) e tratados com melatonina (M) ou melatonina associada com pioglitazona (MP).



Os valores estão expressos como média ± EPM (n = 4 a 5 animais por grupo). *Estatisticamente diferente do grupo C (p<0,05). ** Estatisticamente diferente do grupo D (p<0,05). Teste ANOVA One-Way seguido de Tukey (n de 4 a 5 animais por grupo).
Fonte: Oliveira (2012).

5 DISCUSSÃO

O tratamento precoce e prolongado com melatonina preveniu parcialmente a instalação da desordem metabólica, com maior controle da glicemia e melhora da sensibilidade à insulina, levando a um controle glicêmico mais sustentado nos animais diabéticos, como se pôde ver pelos valores de glicemia semanal, medida pela manhã, de animais alimentados, e pelo menor grau de glicação das proteínas do soro refletida pela determinação de frutosamina. Com o tratamento com melatonina, além da melhora da glicemia, observou-se redução da polidipsia e da polifagia que havia se exacerbado em ratos diabéticos a partir da 8ª semana de vida. A associação com pioglitazona não promoveu melhora adicional ao tratamento com melatonina.

Em estudo prévio (Takada et al., 2007), foi demonstrada uma correlação entre a perda de gordura e resistência à insulina característica desse modelo, e que, com as terapias com antidiabéticos (insulina ou pioglitazona) com início precoce (ao desmame), houve melhorias significativas no perfil metabólico (Takada et al. 2008). A metformina teve pouco ou nenhum efeito em recuperar a massa adiposa. Apesar de ter promovido melhora na resistência à insulina, a metformina foi ineficaz em normalizar o estado metabólico de ratos diabéticos. Esses trabalhos sugerem fortemente que a recuperação trófica e funcional do tecido adiposo é um componente muito importante na recuperação da sensibilidade à insulina e do quadro clínico-laboratorial geral dos animais diabéticos.

Curiosamente, no presente estudo, a melhora da resistência à insulina promovida pelo tratamento com melatonina ocorreu independentemente do aumento da massa de gordura, uma vez que os animais tratados tiveram menor ganho de peso e de massa adiposa, à semelhança dos animais diabéticos. Uma possível explicação para a menor expansão da massa adiposa nos animais induzidos neonatalmente ao diabetes seria a redução no surto de incremento da adiposidade corporal, especialmente durante a puberdade (Hietanen et al., 1977; Herrera et al., 2000). Foi demonstrado previamente (Takada et al., 2007) que animais diabéticos induzidos neonatalmente por STZ apresentaram menor celularidade no tecido adiposo epididimal, e que a menor massa de tecido adiposo foi recuperada pela insulinoterapia ou por pioglitazona, mas não por metformina. No presente estudo, a

melhora da resistência à insulina não foi acompanhada pelo aumento da celularidade do tecido adiposo, mas devido à própria ação da melatonina para melhorar a resposta celular à insulina, provavelmente por aumentar a amplitude de sua sinalização intracelular. Recentemente foi demonstrado que a melatonina desempenha um papel inibitório na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, em cultura, impedindo C/EBPβ (fator nuclear que atua precocemente na diferenciação de adipócitos) de intensificar a expressão gênica de C/EBPα e PPARγ, fatores mestres da finalização da adipogênese (Alonso-Vale et al., 2009). Entretanto, recentemente foi demonstrado que a melatonina, na concentração de 1mM por 72 horas, no 10º dia de diferenciação, aumentou a expressão gênica de C/EBPα e PPAGγ em células 3T3-L1 (González et al. 2012).

Adipócitos isolados de ratos pinealectomizados apresentaram menor tolerância à glicose e menor sensibilidade à insulina em relação aos animais controle (Alonso-Vale et al., 2004; Lima et al., 1998). Em outro estudo com adipócitos isolados e intermitentemente expostos à melatonina em cultura primária (12/12h), foi demonstrado que, durante a presença de melatonina no meio (um procedimento para simular noite no meio de cultura), os adipócitos responderam mais intensamente à insulina do que na ausência de melatonina (Alonso-Vale et al., 2008). Portanto, esse estudo mostrou que há um sinergismo entre melatonina e insulina nos adipócitos modulando a resposta biológica. Esse efeito corrobora com nossos resultados, embora, paradoxalmente, outros estudos mostraram que a melatonina inibe a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas isoladas (Rasmussen et al. 1999; Wolden-Hanson et al. 2000; Rasmussen et al. 2001). O efeito da melatonina sobre a secreção de insulina ocorre devido a uma redução dos níveis de AMPc, através de receptores MT1, embora possa regular o crescimento e a diferenciação das ilhotas pancreáticas, ativando vias de sinalização de receptores de insulina e IGF1 (Picinato et al., 2008). Nossos dados mostram que, embora os animais tratados com melatonina apresentem níveis de insulina semelhante aos animais do grupo de diabéticos e significativamente menores do que controles, o índice HOMAir do grupo M foi estatisticamente inferior ao do grupo D, indicando maior sensibilidade à insulina desses animais. Nossos resultados são consistentes com um estudo anterior, em que o tratamento com melatonina (10 mg/kg, ip) por

duas semanas, melhorou a resposta à insulina de ratos diabéticos induzido por dieta com alto teor de gordura (Shieh et al., 2009).

A estreptozotocina (STZ) induz lesão nas células β pancreáticas por mecanismos já bem descritos (Weiss, 1982; Junod et al., 1969). Quando injetada no período neonatal, a STZ promove uma destruição parcial das ilhotas que reduz sua capacidade de secreção de insulina estimulada pela glicose como visto no grupo D. Apesar de existirem estudos que mostram um efeito protetor da melatonina sobre lesão das células β pancreáticas pela STZ (Yavuz et al., 2003), no presente estudo, o tratamento com melatonina e a associação com piogloitazona a partir da 4ª semana pós-STZ não restauraram a capacidade de secreção de insulina das ilhotas de animais diabéticos. No entanto, animais tratados com melatonina, apesar de apresentarem secreção de insulina prejudicada e menores níveis de insulina plasmática, apresentaram melhor sensibilidade à insulina e controle da glicemia durante o tratamento.

A adiponectina, uma adipocina conhecida por aumentar a sensibilidade à insulina no fígado e no músculo esquelético, via ativação por AMPK e PPARα (Yamauchi et al., 2002), também foi determinada. O tratamento com melatonina, associada ou não com a pioglitazona, aumentou a concentração plasmática de adiponectina nos animais diabéticos para valores semelhantes aos observados nos controles. Isto sugere que a melhora na tolerância à glicose e na resistência à insulina deveu-se, pelo menos em parte, à maior secreção de adiponectina pelo tecido adiposo. Essa descoberta traz mais implicações, uma vez que a adiponectina tem outros efeitos benéficos que são particularmente importantes para o diabetes como antiaterogênese (Fasshauer et al., 2004, Lam; Xu, 2005), hepatoproteção (Xu et al. 2003, Masaki et al. 2004), redução do risco cardiovascular (Shibata et al., 2004, Liao et al., 2005), entre outros. Com o objetivo de avaliar se o menor nível de adiponectina observado nos animais diabéticos se deve a uma menor expressão gênica, avaliamos a expressão desse gene no tecido adiposo PE. Foi observado que, pelo menos nesse tecido, não houve redução da expressão relativa do gene da adiponectina, sugerindo uma alteração pós-transcricional ou até mesmo na secreção dessa adipocina. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de alterações na expressão do gene da adiponectina em tecidos adiposos de outros territórios.

Observou-se um significativo hipogonadismo em animais diabéticos. Como descrito anteriormente em outros trabalhos, essa disfunção gonadal é devido a mudanças na função testicular e no eixo hipotálamo-hipófise-gonada (HPG) encontradas em modelos de diabetes induzido por STZ (Ballester et al., 2004; Bestetti et al., 1985). O tratamento com melatonina retardou o desenvolvimento puberal normal, exacerbando o hipogonadismo. O efeito da melatonina sobre a inibição do eixo HPG foi bem descrito em roedores (Malpaux et al., 2001; Maywood et al., 1995) e, provavelmente, ocorre através da expressão de KISS1, levando à inibição dos neurônios GnRH-érgicos (Ansel et al., 2010). Nos seres humanos, há aumento da resistência à insulina durante a puberdade em crianças normais (Goran; Gower, 2001), mas esse evento ainda não tem sido bem estudado em ratos ainda. Supõe-se que esse aumento fisiológico da resistência à insulina associada ao desenvolvimento puberal pode estar relacionado com o agravamento da diabetes que se observa nos animais diabéticos. Portanto, suge-se que o tratamento prolongado com melatonina e iniciado precocemente pode ter retardado ainda mais o início da puberdade e, consequentemente, contribuído para a pouca resistência à insulina e prevenção do agravamento do diabetes.

Nossos resultados demonstraram que os grupos D, M e MP além de apresentarem redução significativa nos níveis plasmáticos de testosterona, apresentaram também redução significativa nos níveis de leptina comparados ao grupo C (Figura 13B). Já foi demonstrado previamente pelo nosso grupo que adipócitos isolados expostos intermitentemente à melatonina aumentaram a liberação de leptina (Alonso-Vale et al., 2005). Além disso, pacientes não diabéticos tratados com melatonina também apresentaram altos níveis plasmáticos de leptina (Celinski et al., 2011). No entanto, a hipoleptinemia observada nos animais diabéticos (tratados e não tratados) no presente trabalho ocorreu, provavelmente, como uma consequência da intensa e generalizada redução da gordura corporal observada nesses animais, uma vez que a leptinemia é diretamente proporcional à massa adiposa (Mcgregor et al., 1996; Considine et al., 1996; Lönnqvist et al., 1997). Essa correlação direta também foi observada em nossos animais quando foi feita a correlação entre leptinemia e o somatório dos 3 coxins adiposos (SC, PE e RP) como observado na figura 13C. Além disso, outros estudos também já demonstraram uma redução nos níveis plasmáticos de leptina, juntamente com perda de massa adiposa, em animais tratados com melatonina (Rasmussen et al.,

1999; Ríos-Lugo et al., 2010). Além dessas evidências supracitadas, quando quantificamos a expressão do gene da leptina no tecido adiposo PE, observamos que não houve diferença estatística entre os grupos, mostrando que a melatonina não interferiu na expressão de leptina, pelo menos nesse tecido, reforçando ainda mais nossa hipótese. Ressalta-se ainda que a leptina está relacionada ao desenvolvimento e maturação do sistema reprodutor (Clément et al., 1998) e a hipoleptinemia observada nos animais diabéticos (com ou sem tratamento) também contribuiu para o hipogonadismo desses animais.

Com a finalidade de avaliar se esse efeito sensibilizador do tratamento com a melatonina se deve a uma melhor responsividade à insulina do tecido adiposo, nós investigamos o efeitos dos tratamentos sobre o metabolismo do adipócito isolado proveniente dos 3 coxins adiposos (SC, PE e RP). Foi observado que os coxins adiposos dos animais tratados somente com melatonina ou associada com pioglitazona apresentaram boa responsividade e sensibilidade à insulina, o que não ocorreu no grupo D. Dados publicados anteriormente demonstram esse efeito sensibilizador em cultura primária de adipócitos isolados quando a melatonina é adicionada ao meio (Alonso-Vale et al. 2008). O tecido adiposo RP dos animais tratados com melatonina associada com melatonina associada a pioglitazona apresentou uma resposta à insulina significativamente maior que o grupo C e D, sugerindo que o coxim RP apresenta maior responsividade ao tratamento com pioglitazona que os outros dois coxins (SC e PE). A insulina na célula adiposa ativa sua via de sinalização resultando, entre outras coisas, na translocação de transportadores de glicose do tipo 4 (Glut 4), aumentando a densidade desses transportadores na membrana plasmática (Watson, Pessin 2001). A densidade de de Glut 4 por cm^2 pode ser inferida pela quantificação de 2-DG captada por unidade de área de membrana ($pmol/cm^2$). Dessa forma, pode-se concluir que a melhora da sensibilidade a insulina resultante do tratamento com melatonina ou da sua associação com pioglitazona foi devido, pelo menos em parte, à maior translocação de Glut 4 para membrana plasmática em resposta à insulina. Takada et al. (2008) demonstrou que animais diabéticos tratados com pioglitazona apresentaram melhora na captação de glicose basal e máxima, e esse efeito foi atribuído a uma maior expressão gênica e protéica de Glut 4 em adipócitos PE.

Resultados semelhantes foram obtidos quando foram realizados testes de incorporação de glicose em TAG e a sua oxidação. Os coxins adiposos PE e RP

dos animais diabéticos apresentaram menor resposta à insulina para ambos os efeitos, e o tratamento com melatonina recuperou a resposta e, no caso da sua oxidação no tecido PE, a taxa basal foi estatisticamente maior que a do grupo D. Interessantemente, a associação de melatonina com pioglitazona promoveu melhora ainda mais intensa dessas capacidades e significativamente superiores às do grupo D nos 3 coxins adiposos. No tecido SC,em relação à oxidação da glicose, não houve diferenças estatísticas entre os grupos. Nos dois testes supracitados, a resposta que se determina independe do grau de captação de glicose e consequentemente, independe da translocação de Glut 4, pois sendo a concentração de glicose (2 mM no meio de incubação neste ensaio) inferior ao K_m do Glut 4, ela passa a ser o fator limitante da quantidade de glicose captada. (Wheeler, Hinkle 1985). Ao limitarmos o aporte de glicose à célula, como as alterações no ritmo de sua metabolização passam a depender da atividade enzimática da célula, pode-se analisar o efeito da insulina sem a influência do montante de glicose captada. Dessa forma, podemos afirmar que a melhora da sensibilidade a insulina promovida pelos tratamentos se deveu, também, a uma melhora da cascata de sinalização da insulina, que promoveu maior ativação das enzimas oxidativas e lipogênicas quando na presença de insulina.

É importante ressaltar que o efeito do tratamento com melatonina associada com a pioglitazona foi mais proeminente em todos os tecidos tanto no ensaio de incorporação de glicose como no de oxidação. A nossa hipótese é que esse incremento no efeito se deva principalmente a ação da pioglitazona, uma droga conhecida por promover aumento da sensibilidade e melhora da resistência à insulina, inclusive no tecido adiposo (Heald; Cawthorne, 2011). A pioglitazona, pertencente à classe das tiazolidinedionas (TZDs) que agem como agonistas de PPARγ (Heald; Cawthorne, 2011), é classicamente utilizada no tratamento de paciente com diabetes. Estudo recente publicado pelo nosso grupo demonstrou que o tratamento de animais diabéticos (mesmo modelo do presente estudo) com pioglitazona promoveu recuperação da capacidade de incorporar glicose em lipídios e oxidá-la, sendo o efeito mais proeminente na capacidade de oxidar a glicose em CO_2 (Takada et al., 2008). Um efeito indesejado do tratamento com pioglitazona é o ganho de peso e de adiposidade corporal (McLaughlin et al., 2010). Um achado interessante do presente estudo foi o fato de que, apesar de o tratamento com

melatonina associada com a pioglitazona ter melhorado a resposta metabólica do tecido adiposo de animais diabéticos, não houve ganho no peso corporal, nem aumento do peso dos coxins e do tamanho dos adipocitos SC, RP e PE desses animais.

Por fim, no teste de atividade lipolítica, realizado no tecido PE, bservamos que os animais diabéticos apresentaram um atividade lipolítica espontânea estatisticamente menor que a dos animais do grupo C e, somente quando associada com pioglitazona, a melatonina foi capaz de recuperar essa capacidade basal. Nosso grupo demonstrou que a melatonina presente no meio de cultura primária de adipócitos foi capaz de inibir a atividade lipolítica basal e estimulada com isoproterenol sem interferir na expressão gênica da enzima lipolítica HSL (Alonso-Vale et al., 2008). No presente trabalho, também não observamos alteração na expressão de HSL nos animais diabéticos tratados ou não em relação aos animais controles. Em outro trabalho, Takada et al., (2008) demonstrou que animais diabéticos tratados com pioglitazona recuperaram a capacidade lipolítica basal deixando-a maior que a do grupo controle, e a estimulada com isoproterenol foi maior que a dos animais diabéticos e semelhante a do grupo controle. Dessa forma, podemos concluir que a melatonina impediu que a pioglitazona aumentasse ainda mais a capacidade lipolítica basal, porém sozinha não foi capaz de recuperar esta resposta, e que a redução na resposta lipolítica dos animais diabéticos tratados ou não com melatonina não está relacionada à expressão de HSL e perilipina.

A fim de investigar um possível mecanismo de ação do efeito da melatonina sobre a melhora da responsividade à insulina no tecido adiposo, foi realizado a avaliação da expressão proteica por *western botting* no coxim PE. Nossos achados mostram que a quantidade de IRS1 no grupo D foi menor que os ratos controles, entretanto, os animais diabéticos tratados com melatonina apresentaram a expressão dessa proteína semelhante aos animais não diabéticos. O IRS-1 é uma proteína de 180 kDa que é fosforilada em resíduos tirosina pelo receptor de insulina, resultando no recrutamento de várias proteínas que promovem a transdução do sinal. O IRS-1 tem vários resíduos de tirosinas e de serina/treonina que são sujeitos à fosforilação por cinases de proteínas de várias cascatas de sinalização. Geralmente, a fosforilação em tirosina do IRS1 aumenta a sinalização de insulina e a fosforilação em serina/treonina diminui a ação da insulina. Assim, através do seu estado de fosforilação, bem como os seus níveis totais, IRS-1 integra sinais a partir

de múltiplas cascatas de sinalização para estabelecer a capacidade de resposta global da célula à insulina (White, 2002). A regulação transcricional do IRS-1 é complexa e não totalmente descrita, e os intermediários moleculares responsáveis pela redução do IRS-1 níveis de mRNA no tecido adiposo nos animais diabéticos induzidos por STZ no período neonatal não estão definidos e merecem melhor investigação. Os níveis de IRS-1 também são determinados pela degradação da proteína pelo sistema ubiquitina-proteassoma (Sun et al., 1999). Anhê et al. (2004) demonstrou que a melatonina ativa a via do IRS1/Akt em hipotálamo de ratos, independente da estimulação com insulina. Um mecanismo semelhante foi descrito em células de músculo esquelético C1/C2 (Ha et al., 2006). No presente trabalho, o aumento na expressão de IRS1 observado no tecido adiposo PE dos animais diabéticos tratados com melatonina explica, pelo menos em parte, a melhor responsividade à insulina observada nos animais do grupo M.

Além da redução na expressão de IRS1, os animais diabéticos também apresentaram uma redução significativa na expressão de ACC e FAS, duas enzimas envolvidas na síntese de ácidos graxos, que foi recuperada pelo tratamento com melatonina. A ACC é uma enzima citosólica que promove a carboxilação do acetil-CoA citosólico em malonil-CoA, que é a etapa inicial da síntese do ácido graxo. O processo de fosforilação/desfosforilação da ACC pela AMPK exerce um papel crucial no controle da atividade dessa enzima (Winder, 2001; Munday, 2002). Em relação à FAS, embora o principal mecanismo regulatório para essa enzima ocorra a nível transcricional, outros mecanismos pós-trancricionais também contribuem para a atividade dessa enzima (Katsurada et al., 1990; Kim et al., 1992). Esse achado reforça a nossa hipótese de que o tratamento com melatonina aumenta a expressão e/ou ativação de enzimas envolvidas no processo de lipogênese *de novo* e na oxidação da glicose.

Quando avaliamos a expressão gênica da FAS, podemos observar que, apesar de os animais diabéticos não apresentarem uma redução estatisticamente significante em relação aos animais não diabéticos, os animais diabéticos tratados com melatonina apresentaram a expressão dessa enzima estatisticamente maior que a dos animais diabéticos não tratados (grupo D) (figura 23). Esse resultado, analisado em conjunto com a expressão proteica e os ensaios de incorporação de glicose em lipídios, sugere que os animais diabéticos apresentam alguma alteração

pós-transcicional na expressão da FAS no tecido PE, que foi compensada pelo aumento na expressão gênica nos animais diabéticos tratados com melatonina.

Outro resultado interessante no presente estudo foi o aumento da expressão de C/EBPα nos animais diabéticos tratados com melatonina. Já é bem descrito e tem sido exaustivamente estudado o papel do C/EBPα na diferenciação do tecido adiposo (Freytag, Paielli, Gilbert 1994; Lin, Lane, 1994). Entretanto existe um papel metabólico desse fator de transcrição no tecido adiposo que ainda não é totalmente compreendido. No fígado, já é bem estabelecido que C/EBPα é um importante regulador do metabolismo da glucose e dos lipídios e modula a expressão de genes envolvidos na gliconeogênese, no estoque de glicogênio e metabolismo de lipídios (Wang et al., 1995; Inoue et al., 2004) de tal forma que a redução na sua expressão no fígado pode resultar em prejuízo na tolerância à glicose (Inoue et al., 2004). No tecido adiposo, vários genes alvos para C/EBPα foram identificados, incluindo a adipoQ, 11-β hidroxiesteroide desidrogenase (11-β HSD), diacilglicerol aciltransferase (DGAT), receptor β-3 adrenérgico, GLUT4 e leptina (Payne et al., 2007; Qiao et al., 2005; Hollenberg et al., 1997; Hemati et al., 1997; Dixon et al., 2001; Gout et al., 2006). Além disso, alguns estudos sugerem que a expressão de IR e IRS-1 pode ser ativada por C/EBPα, uma vez que existe sítio de ligação para C/EBP na região promotora de ambos, IR e IRS-1 (McKeon, Pham, 1991; Webster et al., 1994; Matsuda et al., 1997) e que IR e IRS-1 podem ser particularmente sensíveis à redução da isoforma α do C/EBP (Wu et al., 1999). Desta forma, a expressão gênica aumentada de C/EBPα nos animais diabéticos tratados com melatonina pode está relacionada ao aumento na expressão gênica de IR e proteica de IRS-1 no tecido adiposo PE desses animais e, consequentemente, à melhor responsividade à insulina desse tecido.

Em conclusão, o tratamento com melatonina e a sua associação com pioglitazona foram capazes de melhorar as alterações metabólicas no modelo de diabetes neonatal induzida por STZ, melhorando a resistência à insulina e, consequentemente, um controle mais duradouro da glicemia. A melhora da resistência à insulina se deveu, pelo menos em parte, à melhora da sensibilidade à insulina nos coxins adiposos SC, PE e RP. Nossos resultados indicam que a melatonina deve ser pensada como uma terapia potencial adjuvante para pacientes

diabéticos. No entanto, é preciso cuidado ao usá-la nos pré-adolescentes diabéticos.

6 CONCLUSÕES

Os animais diabéticos tratados com melatonina apresentaram, em relação aos ratos diabéticos não tratados:

- Melhora do quadro de polifagia e polidipsia.
- Melhor controle glicêmico durante todo o período de tratamento.
- Melhor tolerância à glicose durante o teste oral de tolerância à glicose e melhor sensibilidade à insulina no teste de tolerância à insulina intravenoso.
- Redução no ganho de peso nas primeiras semanas de tratamento, porém sem alteração do peso final.
- Massa adiposa e tamanho dos adipócitos dos coxins subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal semelhantes.
- Secreção de insulina pela ilhota semelhante.
- Comprometimento do desenvolvimento das estruturas sexuais.
- Concentração plasmática de insulina, leptina e testosterona semelhante.
- Maior concentração plasmática de adiponectina.
- Melhor responsividade à insulina no tecido adiposo subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal.
- Aumento da expressão proteica de IRS1, FAS e ACC e na expressão gênica de IR, C/EBPα e FAS.

O tratamento com a melatonina associada com pioglitazona promoveu efeitos semelhantes ao tratamento somente com melatonina.

REFERÊNCIAS*

Ajuwon KM, Spurlock ME. Adiponectin inhibits LPS-induced NF-kappaB activation and IL-6 production and increases PPARgamma2 expression in adipocytes. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;288(5):R1220-5.

Aksoy N, Vural H, Sabuncu T, Aksoy S. Effects of melatonin on oxidative-antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. Cell Biochem Funct. 2003;21(2):121-5.

Alcozer G, Giordano G, Masciocco D. Studies on the epiphysis; influence of aqueous pineal extract on some aspects of carbohydrate metabolism in healthy and eucrine subjects. Arch Maragliano Patol Clin. 1956;12(6):1105-13.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Mukai PY, Borges-Silva CN, Peres SB, Cipolla-Neto J, et al. Melatonin and the circadian entrainment of metabolic and hormonal activities in primary isolated adipocytes. J Pineal Res. 2008;45(4):422-9.

Alonso-Vale MI, Andreotti S, Peres SB, Anhe GF, das Neves Borges-Silva C, Neto JC, et al. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005;288(4):E805-12.

Alonso-Vale MI, Anhê GF, Borges-Silva CN, Andreotti S, Peres SB, Cipolla-Neto J, et al. Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. Metabolism. 2004;53(4):500-6.

Alonso-Vale MI, Peres SB, Vernochet C, Farmer SR, Lima FB. Adipocyte differentiation is inhibited by melatonin through the regulation of C/EBPbeta transcriptional activity. J Pineal Res. 2009;47(3):221-7.

Andersson AK, Sandler S. Melatonin protects against streptozotocin, but not interleukin-1beta-induced damage of rodent pancreatic beta-cells. J Pineal Res. 2001;30(3):157-65.

Anhê 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.

Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. J Biol Rhythms. 2010;25(2):81-91.

Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2003;135(4):539-47.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requeriments for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: http://www.icmje.org [2007 May 22]

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;257(1):79-83.

Armagan A, Uz E, Yilmaz HR, Soyupek S, Oksay T, Ozcelik N. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. Asian J Androl. 2006;8(5):595-600.

Armstrong SM. Melatonin and circadian control in mammals. Experientia. 1989;45(10):932-8.

Bach AG, Wolgast S, Muhlbauer E, Peschke E. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca2+ release from INS1 insulinoma cells. J Pineal Res. 2005;39(3):316-23.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. The stomach is a source of leptin. Nature. 1998;394(6695):790-3.

Bajaj M, Ben-Yehuda O. A big fat wedding: association of adiponectin with coronary vascular lesions. J Am Coll Cardiol. 2006;48(6):1163-5.

Ballester J, Muñoz MC, Domínguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodríguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH- and LH-linked mechanisms. J Androl. 2004;25(5):706-19.

Barb CR, Hausman GJ, Houseknecht KL. Biology of leptin in the pig. Domest Anim Endocrinol. 2001;21(4):297-317.

Batra A, Pietsch J, Fedke I, Glauben R, Okur B, Stroh T, et al. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. Am J Pathol. 2007;170(6):1931-41.

Baydas G, Tuzcu M, Yasar A, Baydas B. Early changes in glial reactivity and lipid peroxidation in diabetic rat retina: effects of melatonin. Acta Diabetol. 2004;41(3):123-8.

Bergström B, Lilja B, Osterlin S, Sundkvist G. Autonomic neuropathy in non-insulin dependent (type II) diabetes mellitus. Possible influence of obesity. J Intern Med. 1990;227(1):57-63.

Bestetti G, Locatelli V, Tirone F, Rossi GL, Müller EE. One month of streptozotocin-diabetes induces different neuroendocrine and morphological alterations in the hypothalamo-pituitary axis of male and female rats. Endocrinology. 1985;117(1):208-16.

Bodner J, Ebenbichler CF, Wolf HJ, Muller-Holzner E, Stanzl U, Gander R, et al. Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization. Placenta. 1999;20(8):677-82.

Bonora E, Moghetti P, Zancanaro C, Cigolini M, Querena M, Cacciatori V, et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. J Clin Endocrinol Metab. 1989;68(2):374-8.

Brakenhielm E, Veitonmaki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, et al. Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(8):2476-81.

Briscoe CP, Hanif S, Arch JR, Tadayyon M. Leptin receptor long-form signalling in a human liver cell line. Cytokine. 2001;14(4):225-9.

Brochu-Gaudreau K, Rehfeldt C, Blouin R, Bordignon V, Murphy BD, Palin MF. Adiponectin action from head to toe. Endocrine. 2010;37(1):11-32.

Brun RP, Spiegelman BM. PPAR gamma and the molecular control of adipogenesis. J Endocrinol. 1997;155(2):217-8.

Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. Dig Dis Sci. 2002;47(10):2336-48.

Bubenik GA. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. J Physiol Pharmacol. 2008;59(Suppl 2):33-51.

Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Pocai A, et al. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. Nat Med. 2008;14(6):667-75.

Caballero B, Vega-Naredo I, Sierra V, Huidobro-Fernandez C, Soria-Valles C, De Gonzalo-Calvo D, et al. Favorable effects of a prolonged treatment with melatonin on the level of oxidative damage and neurodegeneration in senescence-accelerated mice. J Pineal Res. 2008;45(3):302-11.

Cagnacci A. Melatonin in relation to physiology in adult humans. J Pineal Res. 1996;21(4):200-13.

Cao GY, Considine RV, Lynn RB. Leptin receptors in the adrenal medulla of the rat. Am J Physiol. 1997;273(2 Pt 1):E448-52.

Carey AL, Bruce CR, Sacchetti M, Anderson MJ, Olsen DB, Saltin B, et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are not increased in patients with Type 2 diabetes: evidence that plasma interleukin-6 is related to fat mass and not insulin responsiveness. Diabetologia. 2004;47(6):1029-37.

Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, Garcia-Maurino S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. FASEB J. 2004;18(3):537-9.

Celinski K, Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Cichoz-Lach H, Slomka M, et al. Melatonin or L-tryptophan accelerates healing of gastroduodenal ulcers in patients treated with omeprazole. J Pineal Res. 2011;50(4):389-94.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell. 1996;84(3):491-5.

Chen KW, Boyko EJ, Bergstrom RW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Wahl PW, et al. Earlier appearance of impaired insulin secretion than of visceral adiposity in the pathogenesis of NIDDM. 5-Year follow-up of initially nondiabetic Japanese-American men. Diabetes Care. 1995;18(6):747-53.

Chinetti G, Zawadski C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. Biochem Biophys Res Commun. 2004;314(1):151-8.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal: Fisiologia Celular e Função. In: Wajchenberg BL Editor. Tratado de Endocrinologia Clínica. São Paulo: Roca; 1992. p. 83-93.

Cipolla-Neto J, Afeche SC. Glândula Pineal. In: Aires MM Editor. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 805-811.

Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature. 1998;392(6674):398-401.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996;334(5):292-5.

Corpeleijn E, Saris WH, Jansen EH, Roekaerts PM, Feskens EJ, Blaak EE. Postprandial interleukin-6 release from skeletal muscle in men with impaired glucose tolerance can be reduced by weight loss. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(10):5819-24.

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. Diabetes Care. 1992;15(3):318-68.

Di Girolamo M, Mendlinger S, Fertig JW. A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. Am J Physiol. 1971;221(3):850-8.

Diaz B, Blázquez E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. Horm Metab Res. 1986;18(4):225-9.

Dixon TM, Daniel KW, Farmer SR, Collins S. CCAAT/enhancer-binding protein alpha is required for transcription of the beta 3-adrenergic receptor gene during adipogenesis. J Biol Chem. 2001;276(1):722-8.

DREAM (Diabetes Reduction Assessment with ramipril and rosiglitazone Medication) Trial Investigators. Effect of rosiglitazone on the frequency of diabetes in patients with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: a randomized controlled trial. Lancet. 2006;368:1096-105.

Dubocovich ML, Masana MI, Benloucif S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. Adv Exp Med Biol. 1999;460:181-90.

Durante-Mangoni E, Zampino R, Marrone A, Tripodi MF, Rinaldi L, Restivo L, et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with serum imbalance of adiponectin/tumour necrosis factor-alpha in chronic hepatitis C patients. Aliment Pharmacol Ther. 2006;24(9):1349-57.

Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA, Morton NM, Davenport M. Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion. Diabetes. 1997;46(2):313-6.

Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. J Clin Invest. 2002;110(8):1093-103.

Fasshauer M, Paschke R, Stumvoll M. Adiponectin, obesity, and cardiovascular disease. Biochimie. 2004;86(11):779-84.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, et al. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(3):1154-9.

Figenschau Y, Knutsen G, Shahazeydi S, Johansen O, Sveinbjornsson B. Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2001;287(1):190-7.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. Cell. 2004;116(2):337-50.

Foster, D.W. The lipodystrophies and other rare disorders of adipose tissue. In: Fauci, A.S.; Braunwald, E.; Isselbacher, K.J. et al. (Eds.) Harrison´s Principles of Internal Medicine. New York: McGraw-Hill; 1998. p. 2209-2214.

Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW. Integrative physiology of human adipose tissue. Int J Obes Relat Metab Disord. 2003;27(8):875-88.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. Nat Med. 1995;1(12):1311-4.

Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. Genes Dev. 1994;8(14):1654-63.

Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B. Regulation of leptin production in humans. J Nutr. 2000;130(12):3127S-31S.

Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutr Rev. 2002;60(10 Pt 2):S1-14; discussion S68-84, 5-7.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998;395(6704):763-70.

Fujimoto WY. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Am J Med. 2000;108 Suppl 6a:9S-14S.

Funahashi T, Nakamura T, Shimomura I, Maeda K, Kuriyama H, Takahashi M, et al. Role of adipocytokines on the pathogenesis of atherosclerosis in visceral obesity. Intern Med. 1999;38(2):202-6.

Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martinez C, et al. ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. Endocrinology. 2005;146(11):4934-42.

Gao S, Kinzig KP, Aja S, Scott KA, Keung W, Kelly S, et al. Leptin activates hypothalamic acetyl-CoA carboxylase to inhibit food intake. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(44):17358-63.

Garcia RA, Afeche SC, Scialfa JH, do Amaral FG, dos Santos SH, Lima FB, et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. Life Sci. 2008;82(1-2):108-14.

Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells. J Neuroimmunol. 1998;92(1-2):76-84.

Garg A. Clinical review: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(11):3313-25.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Leon LR, Vinson C, Reitman ML. Leptin and diabetes in lipoatrophic mice. Nature. 2000;403(6772):850.

Gern WA, Ralph CL. Melatonin synthesis by the retina. Science. 1979;204(4389):183-4.

Gómez R, Scotece M, Conde J, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. Adiponectin and leptin increase IL-8 production in human chondrocytes. Ann Rheum Dis. 2011;70(11):2052-4.

González A, Alvarez-García V, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin promotes differentiation of 3T3-L1 fibroblasts. J Pineal Res. 2012;52(1):12-20.

Goran MI, Gower BA. Longitudinal study on pubertal insulin resistance. Diabetes. 2001;50(11):2444-50.

Gout J, Tirard J, Thévenon C, Riou JP, Bégeot M, Naville D. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs) regulate the basal and cAMP-induced transcription of the human 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase encoding gene in adipose cells. Biochimie. 2006;88(9):1115-24.

Guerra B, Santana A, Fuentes T, Delgado-Guerra S, Cabrera-Socorro A, Dorado C, et al. Leptin receptors in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 2007;102(5):1786-92.

Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. Pharmacol Ther. 2006;111(1):145-73.

Ha E, Yim SV, Chung JH, Yoon KS, Kang I, Cho YH, et al. Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. J Pineal Res. 2006;41(1):67-72.

Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, et al. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. Diabetes Care. 2006;29(6):1357-62.

Harlow E, Lane D. Antibodies: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988

Hassink SG, de Lancey E, Sheslow DV, Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Considine RV, et al. Placental leptin: an important new growth factor in intrauterine and neonatal development? Pediatrics. 1997;100(1):E1.

Heald M, Cawthorne MA. Dual acting and pan-PPAR activators as potential anti-diabetic therapies. Handb Exp Pharmacol. 2011(203):35-51.

Hemati N, Ross SE, Erickson RL, Groblewski GE, MacDougald OA. Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Correlation with GLUT4 gene expression. J Biol Chem. 1997;272(41):25913-9.

Hermsdorff HH, Monteiro JB. Visceral, subcutaneous or intramuscular fat: where is the problem?. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004;48(6):803-11.

Herrera E, Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. Diabetes Metab Res Rev. 2000;16(3):202-10.

Hietanen E, Greenwood MR. A comparison of lipoprotein lipase activity and adipocyte differentiation in growing male rats. J Lipid Res. 1977;18(4):480-90.

Hollenberg AN, Susulic VS, Madura JP, Zhang B, Moller DE, Tontonoz P, et al. Functional antagonism between CCAAT/Enhancer binding protein-alpha and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma on the leptin promoter. J Biol Chem. 1997;272(8):5283-90.

Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. J Clin Invest. 1994;94(4):1543-9.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. Science. 1993;259(5091):87-91.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(6):1595-9.

Hoyda TD, Fry M, Ahima RS, Ferguson AV. Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. J Physiol. 2007;585(Pt 3):805-16.

Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. J Biol Chem. 1996;271(18):10697-703.

Inoue Y, Inoue J, Lambert G, Yim SH, Gonzalez FJ. Disruption of hepatic C/EBPalpha results in impaired glucose tolerance and age-dependent hepatosteatosis. J Biol Chem. 2004;279(43):44740-8.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION TASK FORCE on Diabetes Health Economics: Facts, figures and forecasts. Brussels: International Diabetes Federation, 1997.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. J Clin Invest. 1969;48(11):2129-39.

Katsurada A, Iritani N, Fukuda H, Matsumura Y, Nishimoto N, Noguchi T, et al. Effects of nutrients and hormones on transcriptional and post-transcriptional regulation of fatty acid synthase in rat liver. Eur J Biochem. 1990;190(2):427-33.

Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, Simsolo RB. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. J Clin Invest. 1995;95(5):2111-9.

Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. Biochem Biophys Res Commun. 2003;312(4):1118-22.

Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF. Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K+ channels in pancreatic beta-cells. Diabetes. 1997;46(6):1087-93.

Kim KS, Park SW, Kim YS. Regulation of fatty acid synthase at transcriptional and post-transcriptional levels in rat liver. Yonsei Med J. 1992;33(3):199-208.

Klein DC, Schaad NL, Namboordiri MA, Yu L, Weller JL. Regulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Biochem Soc Trans. 1992;20(2):299-304.

Klein DC, Weller JL, Moore RY. Melatonin metabolism: neural regulation of pineal serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1971;68(12):3107-10.

Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, Kibayashi E, Kobayashi H, Kihara S, et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-8. Circ Res. 2005;97(12):1245-52.

Kodama T, Iwase M, Nunoi K, Maki Y, Yoshinari M, Fujishima M. A new diabetes model induced by neonatal alloxan treatment in rats. Diabetes Res Clin Pract. 1993;20(3):183-9.

Kopp HP, Kopp CW, Festa A, Krzyzanowska K, Kriwanek S, Minar E, et al. Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003;23(6):1042-7.

Korner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, Kelesidis I, Williams CJ, Kaprara A, et al. Total and high-molecular-weight adiponectin in breast cancer: in vitro and in vivo studies. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(3):1041-8.

Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, et al. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92(3):1129-36.

Krause MP, Liu Y, Vu V, Chan L, Xu A, Riddell MC, et al. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. Am J Physiol Cell Physiol. 2008;295(1):C203-12.

Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. Cell Metab. 2007;6(1):55-68.

Kurcer Z, Parlakpinar H, Vardi N, Tasdemir S, Iraz M, Fadillioglu E, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2007;115(6):365-71.

La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J, Buijs RM. A suprachiasmatic nucleus generated rhythm in basal glucose concentrations. J Neuroendocrinol. 1999;11(8):643-52.

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. 2001;13(12):1025-32.

Lacy PE, Kostianovsky M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. Diabetes. 1967;16(1):35-9.

Lam KS, Xu A. Adiponectin: protection of the endothelium. Curr Diab Rep. 2005;5(4):254-9.

Lanoix D, Beghdadi H, Lafond J, Vaillancourt C. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. J Pineal Res. 2008;45(1):50-60.

Lara-Castro C, Luo N, Wallace P, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin multimeric complexes and the metabolic syndrome trait cluster. Diabetes. 2006;55(1):249-59.

Lardone PJ, Carrillo-Vico A, Naranjo MC, De Felipe B, Vallejo A, Karasek M, et al. Melatonin synthesized by Jurkat human leukemic T cell line is implicated in IL-2 production. J Cell Physiol. 2006;206(1):273-9.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature. 1996;379(6566):632-5.

Lee MH, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM. The adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 activate ERK1/2 through a Src/Ras-dependent pathway and stimulate cell growth. Biochemistry. 2008;47(44):11682-92.

Liao Y, Takashima S, Maeda N, Ouchi N, Komamura K, Shimomura I, et al. Exacerbation of heart failure in adiponectin-deficient mice due to impaired regulation of AMPK and glucose metabolism. Cardiovasc Res. 2005;67(4):705-13.

Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SM, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. Am J Physiol. 1998;275(6 Pt 1):E934-41.

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 FT, Lane MD. CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1994;91(19):8757-61.

Lönnqvist F, Wennlund A, Arner P. Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. Int J Obes Relat Metab Disord. 1997;21(4):255-60.

Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature. 1998;394(6696):897-901.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochem Biophys Res Commun. 1996;221(2):286-9.

Malpaux B, Migaud M, Tricoire H, Chemineau P. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. J Biol Rhythms. 2001;16(4):336-47.

Margraf RR, Lynch GR. Melatonin injections affect circadian behavior and SCN neurophysiology in Djungarian hamsters. Am J Physiol. 1993;264(3 Pt 2):R615-21.

Martins E, Jr., Ferreira AC, Skorupa AL, Afeche SC, Cipolla-Neto J, Costa Rosa LF. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. J Leukoc Biol. 2004;75(6):1116-21.

Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-Ay obese mice. Hepatology. 2004;40(1):177-84.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. Nat Med. 1997;3(9):1029-33.

Matsuda K, Araki E, Yoshimura R, Tsuruzoe K, Furukawa N, Kaneko K, et al. Cell-specific regulation of IRS-1 gene expression: role of E box and C/EBP binding site in HepG2 cells and CHO cells. Diabetes. 1997;46(3):354-62.

Matsuzawa Y, Fujioka S, Tokunaga K, Tarui S. Classification of obesity with respect to morbidity. Proc Soc Exp Biol Med. 1992;200(2):197-201.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. 1985;28(7):412-9.

Maywood ES, Hastings MH. Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. Endocrinology. 1995;136(1):144-53.

McFarlane SI, Banerji M, Sowers JR. Insulin resistance and cardiovascular disease. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(2):713-8.

McGaffin KR, Sun CK, Rager JJ, Romano LC, Zou B, Mathier MA, et al. Leptin signalling reduces the severity of cardiac dysfunction and remodelling after chronic ischaemic injury. Cardiovasc Res. 2008;77(1):54-63.

McGregor GP, Desaga JF, Ehlenz K, Fischer A, Heese F, Hegele A, et al. Radiommunological measurement of leptin in plasma of obese and diabetic human subjects. Endocrinology. 1996;137(4):1501-4.

McKeon C, Pham T. Transactivation of the human insulin receptor gene by the CAAT/enhancer binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 1991;174(2):721-8.

McLaughlin TM, Liu T, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven GM, et al. Pioglitazone increases the proportion of small cells in human abdominal subcutaneous adipose tissue. Obesity. 2010;18(5):926-31.

Milcu SM, Nanu-Ionescu L, Milcu I. The effect of pinealectomy on plasma insulin in rats. In: Wolstenholme GEW, Night J Editores. Pineal Gland. Edinburgh and London: Churchill-Living-stone. 1971. p. 345-357.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. Nature. 2004;428(6982):569-74.

Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nature. 2002;415(6869):339-43.

Montilla PL, Vargas JF, Túnez IF, Muñoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. J Pineal Res. 1998;25(2):94-100.

Morton NM, Emilsson V, Liu YL, Cawthorne MA. Leptin action in intestinal cells. J Biol Chem. 1998;273(40):26194-201.

Motoshima H, Wu X, Mahadev K, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. Biochem Biophys Res Commun. 2004;315(2):264-71.

Müller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. J Biol Chem. 1997;272(16):10585-93.

Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. Biochem Soc Trans. 2002;30(Pt 6):1059-64.

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Jr., Tapscott EB, Coleman RA. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. Diabetes. 1997;46(8):1360-3.

Naji L, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Calvo JR. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. Life Sci. 2004;74(18):2227-36.

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. J Biochem. 1996;120(4):803-12.

Neumeier M, Weigert J, Schaffler A, Wehrwein G, Muller-Ladner U, Scholmerich J, et al. Different effects of adiponectin isoforms in human monocytic cells. J Leukoc Biol. 2006;79(4):803-8.

Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J Biol Chem. 2000;275(40):31311-7.

Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, et al. The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913. Diabetes. 1985;34(10):1055-8.

Okada T, Saito E, Kuromori Y, Miyashita M, Iwata F, Hara M, et al. Relationship between serum adiponectin level and lipid composition in each lipoprotein fraction in adolescent children. Atherosclerosis. 2006;188(1):179-83.

Oliveira AC. O tratamento com melatonina, associado ou não à pioglitazona, melhora a resposta metabólica do tecido adiposo em ratos diabéticos. [Tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem. 2003;278(11):9073-85.

Payne VA, Au WS, Gray SL, Nora ED, Rahman SM, Sanders R, et al. Sequential regulation of diacylglycerol acyltransferase 2 expression by CAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) and C/EBPalpha during adipogenesis. J Biol Chem. 2007;282(29):21005-14.

Paz-Filho G, Wong ML, Licinio J. Ten years of leptin replacement therapy. Obes Rev. 2011;12(5):e315-23.

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

Peschke E, Bach AG, Mühlbauer E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. J Pineal Res. 2006;40(2):184-91.

Peschke E, Fauteck JD, Musshoff U, Schmidt F, Beckmann A, Peschke D. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. J Pineal Res. 2000;28(3):156-64.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001;29(9):e45.

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. 2002;33(3):172-7.

Picinato MC, Hirata AE, Cipolla-Neto J, Curi R, Carvalho CR, Anhê GF, et al. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. J Pineal Res. 2008;44(1):88-94.

Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia. 1997;40(11):1286-92.

Pineiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, et al. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. FEBS Lett. 2005;579(23):5163-9.

Pischon T, Nothlings U, Boeing H. Obesity and cancer. Proc Nutr Soc. 2008;67(2):128-45.

Portha B, Blondel O, Serradas P, McEvoy R, Giroix MH, Kergoat M, et al. The rat models of non-insulin dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin. Diabete Metab. 1989;15(2):61-75.

Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. JAMA. 2001;286(3):327-34.

Punyadeera C, Zorenc AH, Koopman R, McAinch AJ, Smit E, Manders R, et al. The effects of exercise and adipose tissue lipolysis on plasma adiponectin concentration and adiponectin receptor expression in human skeletal muscle. Eur J Endocrinol. 2005;152(3):427-36.

Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. Nat Med. 2004;10(5):524-9.

Qiao L, Maclean PS, Schaack J, Orlicky DJ, Darimont C, Pagliassotti M, et al. C/EBPalpha regulates human adiponectin gene transcription through an intronic enhancer. Diabetes. 2005;54(6):1744-54.

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(2):1009-12.

Rasmussen DD, Mitton DR, Larsen SA, Yellon SM. Aging-dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat metabolic and behavioral responses. J Pineal Res. 2001;31(1):89-94.

Reiter RJ, Tan DX, Burkhardt S. Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. Mech Ageing Dev. 2002;123(8):1007-19.

Reyes-Toso CF, Rosón MI, Albornoz LE, Damiano PF, Linares LM, Cardinali DP. Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin. J Pineal Res. 2002;33(2):81-6.

Ríos-Lugo MJ, Cano P, Jimenez-Ortega V, Fernandez-Mateos MP, Scacchi PA, Cardinali DP, et al. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats. J Pineal Res.49(4):342-8.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J Biol Chem. 1964;239:375-80.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2a ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989, p. 174-184.

Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C. Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. Cell Immunol. 2001;211(1):30-6.

Schaffler A, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Buchler C. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. Endocr Rev. 2006;27(5):449-67.

Schaffler A, Scholmerich J, Salzberger B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. Trends Immunol. 2007;28(9):393-9.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem. 1995;270(45):26746-9.

Schreyer SA, Chua SC, LeBoeuf RC. Obesity and diabetes in TNF-alpha receptor-deficient mice. J Clin Invest. 1998;102(2):402-11.

Segal KR, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men. Diabetes. 1996;45(7):988-91.

Seip M, Trygstad O. Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). Acta Paediatr Suppl. 1996;413:2-28.

Sepulveda-Lavados A, Bastard JP, Attal M, Belin MF, Sachon C, Verny C, et al. Association between intra-abdominal fat and hypertension in android obese diabetics. Ann Med Interne (Paris). 1996;147(6):393-16.

Sharma M, Briyal S, Gupta YK. Effect of alpha lipoic acid, melatonin and trans resveratrol on intracerebroventricular streptozotocin induced spatial memory deficit in rats. Indian J Physiol Pharmacol. 2005;49(4):395-402.

Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. J Biol Chem. 2004;279(27):28670-4.

Shieh JM, Wu HT, Cheng KC, Cheng JT. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKCzeta-Akt-GSK3beta pathway in hepatic cells. J Pineal Res. 2009;47(4):339-44.

Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. Pharmacol Rev. 2003;55(2):325-95.

Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(5):1810-3.

Sobhani I, Bado A, Vissuzaine C, Buyse M, Kermorgant S, Laigneau JP, et al. Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. Gut. 2000;47(2):178-83.

Speh JC, Moore RY. Retinohypothalamic tract development in the hamster and rat. Brain Res Dev Brain Res. 1993;76(2):171-81.

Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, et al. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. Lancet. 2003;361(9353):226-8.

Stebelová K, Herichová I, Zeman M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. Neuro Endocrinol Lett. 2007;28(2):159-65.

Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. Nat Genet. 1998;18(3):213-5.

Stumpf I, Muhlbauer E, Peschke E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. J Pineal Res. 2008;45(3):318-27.

Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaya SV, Kubyshin VL, Lapshina EA, Bryszewska M, et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. Eur J Pharmacol. 2007;569(3):180-7.

Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. Experientia. 1989;45(10):922-32.

Sun XJ, Goldberg JL, Qiao LY, Mitchell JJ. Insulin-induced insulin receptor substrate-1 degradation is mediated by the proteasome degradation pathway. Diabetes. 1999;48(7):1359-64.

Tajima D, Masaki T, Hidaka S, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Acute central infusion of leptin modulates fatty acid mobilization by affecting lipolysis and mRNA expression for uncoupling proteins. Exp Biol Med (Maywood). 2005;230(3):200-6.

Takada J, Fonseca-Alaniz MH, de Campos TB, Andreotti S, Campana AB, Okamoto M, et al. Metabolic recovery of adipose tissue is associated with improvement in insulin resistance in a model of experimental diabetes. J Endocrinol. 2008;198(1):51-60.

Takada J, Machado MA, Peres SB, Brito LC, Borges-Silva CN, Costa CE, et al. Neonatal streptozotocin-induced diabetes mellitus: a model of insulin resistance associated with loss of adipose mass. Metabolism. 2007;56(7):977-84.

Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. Biochim Biophys Acta. 1999;1472(1-2):206-14.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res. 2007;42(1):28-42.

Tan KC, Xu A, Chow WS, Lam MC, Ai VH, Tam SC, et al. Hypoadiponectinemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(2):765-9.

Tanida M, Shen J, Horii Y, Matsuda M, Kihara S, Funahashi T, et al. Effects of adiponectin on the renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. Exp Biol Med (Maywood). 2007;232(3):390-7.

Tartaglia LA. The leptin receptor. J Biol Chem. 1997;272(10):6093-6.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995;83(7):1263-71.

Trayhurn P. Adipose tissue in obesity--an inflammatory issue. Endocrinology. 2005;146(3):1003-5.

Tsuchiya T, Shimizu H, Horie T, Mori M. Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor. Eur J Pharmacol. 1999;365(2-3):273-9.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. Nature. 1997;389(6651):610-4.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem. 2003;278(41):40352-63.

Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmet P, Collier GR. Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. J Endocrinol. 1997;155(3):R5-7.

Wang J, Liu R, Hawkins M, Barzilai N, Rossetti L. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. Nature. 1998;393(6686):684-8.

Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, et al. Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. Science. 1995;269(5227):1108-12.

Wang Y, Lam JB, Lam KS, Liu J, Lam MC, Hoo RL, et al. Adiponectin modulates the glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling pathway and attenuates mammary tumorigenesis of MDA-MB-231 cells in nude mice. Cancer Res. 2006;66(23):11462-70.

Watson RT, Pessin JE. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. Recent Prog Horm Res. 2001;56:175-93.

Webster NJ, Kong Y, Cameron KE, Resnik JL. An upstream element from the human insulin receptor gene promoter contains binding sites for C/EBP beta and NF-1. Diabetes. 1994;43(2):305-12.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003;112(12):1796-808.

Weiss RB. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. Cancer Treat Rep. 1982;66(3):427-38.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(5):1930-5.

Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. Annu Rev Physiol. 1985;47:503-17.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2002;283(3):E413-22.

Winder WW. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. J Appl Physiol. 2001;91(3):1017-28.

Winer N, Sowers JR. Epidemiology of diabetes. J Clin Pharmacol. 2004;44(4):397-405.

Wolden-Hanson T, Mitton DR, McCants RL, Yellon SM, Wilkinson CW, Matsumoto AM, 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(2):487-97.

Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2004;323(2):630-5.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. Mol Cell. 1999;3(2):151-8.

Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2004;316(3):924-9.

Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. J Clin Invest. 2003;112(1):91-100.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 2003;423(6941):762-9.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. Nat Med. 2002;8(11):1288-95.

Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, et al. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. Nat Med. 2007;13(3):332-9.

Yavuz O, Cam M, Bukan N, Guven A, Silan F. Protective effect of melatonin on beta-cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. Acta Histochem. 2003;105(3):261-6.

Yokota T, Meka CS, Kouro T, Medina KL, Igarashi H, Takahashi M, et al. Adiponectin, a fat cell product, influences the earliest lymphocyte precursors in bone marrow cultures by activation of the cyclooxygenase-prostaglandin pathway in stromal cells. J Immunol. 2003;171(10):5091-9.

Zhang S, Li W, Gao Q, Wei T. Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages. Eur J Pharmacol. 2004;501(1-3):25-30.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994;372(6505):425-32.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. Circulation. 2002;105(7):804-9.

ANEXOS

ANEXO A

ARTIGOS DE PERÍODOS

Artigo 1 **Oliveira AC**, Andreotti S, Farias TD, Torres-Leal FL, de Proença AR, Campaña AB, et al. Metabolic Disorders and Adipose Tissue Insulin Responsiveness in Neonatally STZ-Induced Diabetic Rats Are Improved by Long-Term Melatonin Treatment. Endocrinology. 2012.

Artigo 2 Berti DA, Russo LC, Castro LM, Cruz L, Gozzo FC, Heimann JC, Lima FB, **Oliveira AC**, Andreotti S, Prada PO, Heimann AS, Ferro ES. Identification of intracellular peptides in the rat adipose tissue. Artigo Submetido (*Proteomics*).

Artigo 3 Coelho-de-Souza AN, Lahlou S, Barreto JE, Yum ME, **Oliveira AC**, Oliveira HD, et al. Essential oil of Croton zehntneri and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer. Fundam Clin Pharmacol. 2012.

Artigo 4 Leonhardt V, Leal-Cardoso JH, Lahlou S, Albuquerque AA, Porto RS, Celedônio NR, **Oliveira AC**, Pereira RF, Silva LP, Garcia-Teófilo TM, Silva AP, Magalhães PJ, Duarte GP, Coelho-de-Souza AN. Antispasmodic effects of essential oil of Pterodon polygalaeflorus and its main constituent β-caryophyllene on rat isolated ileum. Fundam Clin Pharmacol. 2010;24(6):749-58.

Artigo 5 Sousa PJ, Linard CF, Azevedo-Batista D, **Oliveira AC**, Coelho-de-Souza AN, Leal-Cardoso JH. Antinociceptive effects of the essential oil of Mentha x villosa leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice. Braz J Med Biol Res. 2009;42(7):655-9.

Endocrinology. First published ahead of print February 28, 2012 as doi:10.1210/en.2011-1675

Metabolic Disorders and Adipose Tissue Insulin Responsiveness in Neonatally STZ-Induced Diabetic Rats Are Improved by Long-Term Melatonin Treatment

Ariclécio C. de Oliveira, Sandra Andreotti, Talita da S.M. Farias, Francisco L. Torres-Leal, André R.G. de Proença, Amanda B. Campaña, Arnaldo H. de Souza, Rogério A.L. Sertié, Ângelo R. Carpinelli, José Cipolla-Neto, and Fábio B. Lima

Superior Institute of Biomedical Sciences (A.C.d.O.), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará 60135-420, Brazil; and Department of Physiology and Biophysics (A.C.d.O., S.A., T.d.S.M.F., F.L.T.-L., A.R.G.d.P., A.B.C., A.H.d.S., R.A.L.S., A.R.C., J.C.-N., F.B.L.), Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil

Diabetes mellitus is a product of low insulin sensibility and pancreatic β-cell insufficiency. Rats with streptozotocin-induced diabetes during the neonatal period by the fifth day of age develop the classic diabetic picture of hyperglycemia, hypoinsulinemia, polyuria, and polydipsia aggravated by insulin resistance in adulthood. In this study, we investigated whether the effect of long-term treatment with melatonin can improve insulin resistance and other metabolic disorders in these animals. At the fourth week of age, diabetic animals started an 8-wk treatment with melatonin (1 mg/kg body weight) in the drinking water at night. Animals were then killing, and the sc, epididymal (EP), and retroperitoneal (RP) fat pads were excised, weighed, and processed for adipocyte isolation for morphometric analysis as well as for measuring glucose uptake, oxidation, and incorporation of glucose into lipids. Blood samples were collected for biochemical assays. Melatonin treatment reduced hyperglycemia, polydipsia, and polyphagia as well as improved insulin resistance as demonstrated by constant glucose disappearance rate and homeostasis model of assessment-insulin resistance. However, melatonin treatment was unable to recover body weight deficiency, fat mass, and adipocyte size of diabetic animals. Adiponectin and fructosamine levels were completely recovered by melatonin, whereas neither plasma insulin level nor insulin secretion capacity was improved in diabetic animals. Furthermore, melatonin caused a marked delay in the sexual development, leaving genital structures smaller than those of nontreated diabetic animals. Melatonin treatment improved the responsiveness of adipocytes to insulin in diabetic animals measured by tests of glucose uptake (sc, EP, and RP), glucose oxidation, and incorporation of glucose into lipids (EP and RP), an effect that seems partially related to an increased expression of insulin receptor substrate 1, acetyl-coenzyme A carboxylase and fatty acid synthase. In conclusion, melatonin treatment was capable of ameliorating the metabolic abnormalities in this particular diabetes model, including insulin resistance and promoting a better long-term glycemic control. (*Endocrinology* 153: 0000–0000, 2012)

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.
Copyright © 2012 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2011-1675 Received August 24, 2011. Accepted February 2, 2012.

Abbreviations: ACC, Acetyl-coenzyme A carboxylase; b.w., body weight; C group, control group; CV, coefficient of variation; 2-DG, 2-deoxy-D-glucose; D group, diabetic group; DM, diabetes mellitus; EP, epididymal; FAS, fatty acid synthase; Glut 4, glucose transporter type 4; GTT, glucose tolerance test; HDLc, high-density lipoprotein cholesterol; HOMA-IR, homeostasis model of assessment-insulin resistance; IRS1, insulin receptor substrate 1; ITT, insulin tolerance test; K_{ITT}, glucose disappearance rate; M group, melatonin group; MT1, melatonin receptor subtype 1; NEFA, nonesterified fatty acid; po, *per os*; RP, retroperitoneal; STZ, streptozotocin; TAG, triacylglycerol.

Copyright (C) 2012 by The Endocrine Society

Identification of intracellular peptides in the rat adipose tissue

Denise A. Berti[1], Lilian C. Russo[1], Leandro M. Castro[1], Lilian Cruz[1], Fábio C. Gozzo[2], Joel C. Heimann[3], Fabio B. Lima[4], Ariclécio C. Oliveira[4], Sandra Andreotti[4], Patrícia O. Prada[2] Andrea S. Heimann[5] and Emer S. Ferro[1*]

Departments of [1]Cell Biology and Development, [4]Phisiology and Biophysics, Institute of Biomedical Sciences, 05508-900, and [3]School of Medicine, 01246-903, University of São Paulo, São Paulo; [5]Proteimax Biotechnology LTDA, 06713-330, Cotia; [2]Campinas State University, 13083-862, Campinas; SP, Brazil.

[*]**Corresponding author**:
Emer S. Ferro, Ph.D.
Professor
Department of Cell Biology and Development
University of São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes 1524, S435
São Paulo, SP, 05508-00

Phone: +55-11-3091-7310
Fax: +55-11-3091-7402
e-mail: eferro@usp.br

Abbreviations: WD, Western diet; CD, control diet; TMAB, 4-trimethylammoniumbutyryl; D9-TMAB, TMAB containing nine atoms of deuterium; D0-TMAB, TMAB containing no deuterium; EP24.15, endopeptidase 24.15; EP24.16, endopeptidase 24.16; QFS, quenched fluorescent substrate; AFU, arbitrary fluorescence units; IBMX, 3-isobutyl-1-methylxanthine; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane sulfonate; KRH, Krebs Ringer Hepes buffer; 3H-2DG, 2-deoxi-D-[3H]-glucose

Key words: intracellular peptides; peptidases; insulin resistance; obesity; adipose

Total number of words: 11061

Summary

Peptides generated in the intracellular environment by the proteasome have been suggested to modulate G-protein coupled receptor signal transduction modulating protein interactions within cells. Moreover, a previous study suggested that a shift in the intracellular peptide profile could help to improve insulin resistance in a model of mice that are fed with a high fat diet. Here, our aim was to identify specific intracellular peptides in the adipose tissue of Wistar rats that could be involved in the physiology of the body weight control. Using semi-quantitative mass spectrometry and LC/MS/MS analyses we identified ten peptides in the epididymal adipose tissue of these animals and found that three peptides were slightly increased by at least 1.7-fold in rats that were fed with a high caloric Western diet when compared to rats fed with a control diet. Two of these peptides that the relative concentrations increased in the adipose tissue of animals fed with a Western diet were further investigated and suggested to bind to specific proteins present in the cytosol o adipose tissue. These peptides were also shown to slightly increase insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Together, these results corroborate the previous suggestions that intracellular peptides could be functional within adipose cells.

Fundamental & Clinical Pharmacology

doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.01021.x

ORIGINAL ARTICLE

Essential oil of *Croton zehntneri* and its major constituent anethole display gastroprotective effect by increasing the surface mucous layer

Andrelina N. Coelho-de-Souza[a], Saad Lahlou[a], João E.F. Barreto[a], Maria E.M. Yum[a], Ariclécio C. Oliveira[a], Hermógenes D. Oliveira[a], Nathalia R. Celedônio[a], Roney G.F. Feitosa[a], Gloria P. Duarte[b], Cláudia F. Santos[a], Aline A.C. de Albuquerque[a], José H. Leal-Cardoso[a]*

[a]*Superior Institute of Biomedical Sciences, State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*
[b]*Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

Keywords
Anethole,
Croton zehntneri,
essential oil,
gastric mucus,
gastric ulcer,
non-protein sulfhydryl groups

Received 22 March 2011;
revised 10 November 2011;
accepted 22 November 2011

*Correspondence and reprints:
lealcard@gmail.com

ABSTRACT

Croton zehntneri, a plant native to northeastern Brazil, is widely used in folk medicine to treat gastrointestinal problems and has rich essential oil content. The effects of the essential oil of *Croton zehntneri* (EOCZ) and its main constituent anethole on several models of gastric lesions were studied in mice and rats. Oral treatment with EOCZ and anethole, both at doses of 30–300 mg/kg, caused similar and dose-dependent gastroprotection against ethanol- and indomethacin-induced gastric damage, but did not change cold-restraint stress-induced ulcers in rats. Furthermore, EOCZ and anethole (both at 30 and 300 mg/kg) similarly and significantly increased the mucus production by the gastric mucosa, measured by Alcian blue binding, in ethanol-induced ulcer model. However, at the same doses, neither EOCZ nor anethole promoted significant alteration in gastric production of non-protein sulfhydryl groups. In pylorus-ligated model, neither EOCZ nor anethole (both at 30 and 300 mg/kg) had a significant effect on the volume of gastric juice, pH, or total acidity. The results of this study show for the first time that EOCZ possesses a gastroprotective potential, an effect mostly attributed to the action of anethole. This activity is related predominantly to the ability of EOCZ and anethole to enhance the production of gastric wall mucus, an important gastroprotective factor. Furthermore, they suggest that EOCZ has potential therapeutic application for the treatment of gastric ulcers.

INTRODUCTION

Croton zehntneri Pax et Hoffm. Vel aff. (Euphorbiaceae), is an aromatic bush native to northeastern Brazil, where it is popularly called 'canela de cunhã' [1]. It has a rich essential oil content (2–3% of leaf dry weight) comprised of several terpenes [1,2]. Its leaves also are used to flavor food and extracts of its bark and leaves are employed, as decoctions or infusions, to relieve disturbances of gastrointestinal function such as gastrointestinal pains and colic [1,3,4].

The essential oil of *Croton zehntneri* (OECZ) and its main constituents, anethole and estragole, have been reported to exert antispasmodic effects in a variety of smooth muscle preparations, but their effects are relatively selective for gastrointestinal preparations [5,6], justifying the use of the plant in folk medicine. In mice, EOCZ induces antinociception, probably by an indirect mechanism such as an anti-inflammatory effect [7]. Recently, it was reported that the intravenous injections of EOCZ induced biphasic changes in blood pressure in conscious normotensive rats [8]. Initially, a rapid bradycardia occurred coincidentally with an arterial hypotension (i.e. vagus reflex) and then an increase in blood pressure. Further studies carried out in anesthetized rats showed that EOCZ-induced capsaicin-like

© 2012 The Authors Fundamental and Clinical Pharmacology © 2012 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

doi: 10.1111/j.1472-8206.2009.00800.x

ORIGINAL ARTICLE

Antispasmodic effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* and its main constituent β-caryophyllene on rat isolated ileum

Valeria Leonhardt[a], José H. Leal-Cardoso[a], Saad Lahlou[a], Aline A.C. Albuquerque[a], Romulo S. Porto[a], Natalia R. Celedônio[a], Ariclecio C. Oliveira[a], Renalison F. Pereira[a], Leidiane P. Silva[a], Taylena M.N. Garcia-Teófilo[a], Anna P.F.S. Silva[a], Pedro J.C. Magalhães[b], Gloria P. Duarte[c], Andrelina N. Coelho-de-Souza[a]*

[a]*Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*
[b]*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*
[c]*Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

Keywords
antispasmodic effect,
essential oil,
ileal smooth muscle,
Pterodon polygalaeflorus,
β-caryophyllene

Received 20 April 2009;
revised 13 August 2009,
16 October 2009;
accepted 6 November 2009

*Corresponding and reprints:
andrelinanoronha@gmail.com

ABSTRACT

This study investigates the effects of essential oil of *Pterodon polygalaeflorus* (EOPP) and β-caryophyllene (β-CAR). EOPP and β-CAR relaxed the basal tone of ileum smooth muscle in a concentration-dependent manner (IC_{50}s = 394.35 ± 62.12 and 68.65 ± 9.51 μg/mL respectively), an effect that was unaltered by hexamethonium, L-nitroarginine methyl ester or indomethacin. Both EOPP and β-CAR evoked a concentration-dependent relaxation of ileum pre-contracted with KCl with an IC_{50} value of 107.78 ± 10.47 and 17.35 ± 0.75 μg/mL, respectively. EOPP and β-CAR inhibited the contractions induced by acetylcholine (ACh) and by KCl. In ileal preparations, the $CaCl_2$-induced contractions were reduced by EOPP (300 μg/mL) and β-CAR (100 μg/mL). Furthermore, $CaCl_2$-induced contractions were also reduced by EOPP (300 μg/mL) and β-CAR (100 μg/mL) in ileal preparations pretreated with ACh under Ca^{2+}-free condition and in the presence of verapamil. EOPP (100 and 300 μg/mL) and β-CAR (30 and 100 μg/mL) reduced the ACh-induced contractions of isolated rat ileum under Ca^{2+}-free conditions. In the presence of high KCl and Ca^{2+}-free conditions, EOPP (300 μg/mL) and β-CAR (100 μg/mL) reduced the contractions induced by barium. A similar effect was also observed with verapamil. It is concluded that (i) β-CAR is an important constituent involved in the myorelaxant and antispasmodic effects induced by EOPP; (ii) the inhibitory effect on intestinal contractility is myogenic and seems mainly mediated through an intracellular mechanism. However, the ability of EOPP and β-CAR to decrease Ca^{2+} influx through cytoplasmic membrane could not be discounted.

INTRODUCTION

The genus *Pterodon* comprises few species widely distributed over several regions in Brazil. Their seeds are commercially available in the medicinal flora market being largely used for their pharmacological properties. Oil from their fruits inhibits skin penetration of *Schistosoma mansoni* cercaria [1], and hydroalcoholic extracts

© 2009 The Authors Journal compilation © 2009 Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique

Brazilian Journal of Medical and Biological Research (2009) 42: 655-659
ISSN 0100-879X Short Communication

Antinociceptive effects of the essential oil of *Mentha x villosa* leaf and its major constituent piperitenone oxide in mice

P.J.C. Sousa[1], C.F.B.M. Linard[2], D. Azevedo-Batista[2], A.C. Oliveira[2], A.N. Coelho-de-Souza[2] and J.H. Leal-Cardoso[2]

[1]Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil
[2]Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Abstract

Mentha x *villosa* Huds (Labiatae) is an aromatic herb widely used in folk medicine. Since the essential oil of the herb has many pharmacological activities, including antispasmodic effects, we determined whether the oil and its major constituent, piperitenone oxide (PO), have antinociceptive activity. The essential oil of *M. x villosa* (EOMV) and PO administered orally at 200 mg/kg (vehicle: 0.1% Tween 80 in water) significantly reduced the writhings induced by acetic acid from control values of 59.5 ± 3.1 s (N = 10) to 31.9 ± 2.8 s (N = 10) and 23.8 ± 3.4 s (N = 10), respectively. When administered at 100 and 200 mg/kg, EOMV reduced the paw licking time for the second phase of the formalin test from the control value of 20.6 ± 2.1 s (N = 13) to 5.3 ± 2.2 s (N = 12) and 2.7 ± 1.2 s (N = 18), respectively. At 100 and 200 mg/kg, PO reduced this second phase to 8.3 ± 2.7 s (N = 12) and 3.0 ± 1.2 s (N = 10), respectively. This effect of EOMV and PO was not reversed by naloxone. EOMV and PO had no significant effect on the first phase of the formalin test. As evaluated by the hot-plate and tail immersion test, EOMV and PO, at doses up to 200 mg/kg, showed no analgesic activity. These results show that EOMV and PO have antinociceptive activity and suggest that this effect is probably an indirect anti-inflammatory effect, which does not involve the central nervous system.

Key words: *Mentha x villosa* essential oil; Analgesia; Nociception; Anti-inflammatory effect; Piperitenone oxide

Introduction

Many mentha species are used all over the world as coleretic, spasmolytic, and analgesic agents (1). In the Northeast of Brazil, *Mentha x villosa* Huds (Labiatae), an aromatic herb, is widely used in folk medicine as a stomachic and anxiolytic agent, and for the treatment of menstrual cramps and diarrhea with colic and blood in the stools (2). Its leaves also are used to flavor food.

Earlier studies with *Mentha x villosa* have reported its antiparasitic activity in amebiasis, giardiasis, and urogenital trichomoniasis (3). In our laboratory, we have shown that the essential oil of *M. x villosa* (EOMV) blocks excitation-contraction coupling in skeletal muscle and causes contraction by releasing Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum (4). Piperitenone oxide (PO), the major constituent of EOMV, exerts an antispasmodic effect on the intestinal smooth muscle of guinea pigs (5). In conscious rats, intravenous administration of EOMV elicited immediate and dose-dependent decreases in mean aortic pressure and heart rate (6). Pretreatment of rats with hexamethonium reduced the EOMV-induced bradycardia without affecting the hypotension and suggested that the activity of this essential oil has neural and myogenic components (6). In both DOCA-salt-hypertensive and uninephrectomized control conscious rats, EOMV decreased mean aortic pressure and heart rate in a dose-dependent manner, and its action in hypertensive animals was enhanced compared to the uninephrectomized controls (7). The major constituent of EOMV has been reported to induce a significant and dose-

Correspondence: J.H. Leal-Cardoso, Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus Itaperi, 60740-000 Fortaleza, CE, Brasil. Fax: +55-85-3101-9810. E-mail: lealcard@gmail.com

Research supported by CNPq, CAPES, FUNCAP, Colégio Christus.
Received July 10, 2008. Accepted May 19, 2009.