

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

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 (12^a 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 lipídios (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/EBP α e FAS, e o grupo MP mostraram expressão gênica aumentada de G6PDH e C/EBP α . 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/EBP α and FAS, and group MP showed increased gene expression of G6PDH and C/EBP α . 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.

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-Margalef, Martin-Romero, 2001), condrocitos 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 síntese 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 (Muonio 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 (PPAR α) (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 efeitos 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 condrocitos 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 cerca 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 está associada com melhores respostas na sensibilidade à insulina e tolerância 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 α_1 e β_1 adrenérgicos nos pinealócitos, desencadeando uma cascata de sinalização que promove a ativação de uma enzima passo-limitante da síntese de melatonina, a arilalquilamina N-acetyltransferase (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-acetyltransferase (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 (PPAR γ), 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 PPAR γ , já foram utilizadas em larga escala na prática clínica no controle glicêmico de pacientes com diabetes tipo 2 (DREAM, 2006). O PPAR γ 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 IR β 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.

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/EBP α 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. Pinealecotomy 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 requirements 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 PPAR α , PPAR γ , 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, Coppock 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, Laferriere 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, Scottece 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 lactotropin, but block the gonadotropin 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, Schultheiss T, et al. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for 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/EBP β) and C/EBP α 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. Diabète 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-Margalef 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.