SANDRA CAMPOS RODRIGUES

EFEITOS DA PINEALECTOMIA E DO BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DE GLICOCORTICÓIDES SOBRE AS FUNÇÕES METABÓLICAS E INFLAMATÓRIAS HEPÁTICAS

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Silvana A. Bordin da Silva

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

RODRIGUES, S. C. **Efeitos da pinealectomia e do bloqueio da sinalização do receptor de glicocorticóides sobre as funções metabólicas e inflamatórias hepáticas.** 2015. 107 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os ritmos biológicos circadianos garantem a relação temporal entre os seres e o ambiente. A regulação metabólica se relaciona à ritmicidade dos ciclos de claro-escuro, com importância das ações da melatonina e dos glicocorticóides no fígado. Investigamos o papel dos glicocorticóides no ajuste metabólico mediado pela secreção rítmica de melatonina e no contexto inflamatório hepático. Ratos W*istar* machos pinealectomizados tratados ou não com RU 486 tiveram o padrão circadiano circulante de corticosterona, insulina e glicose aferido ao longo de 8 ZTs. No ZT10, analisou-se a expressão de RNAm e protéica envolvidas em ações metabólicas e inflamatórias. Os resultados dos testes *in vivo* de tolerância à glicose e ao piruvato, secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) e avaliação no fígado da p-AKT estimulada no ZT 10, em conjunto com as alterações na composição corpórea, conteúdo de glicogênio e histologia do fígado, apontam maior influência da sinalização por corticosterona no metabolismo da glicose e resposta insulínica hepática, assim como correlação dos efeitos da melatonina e dos glicocorticóides no metabolismo energético e na modulação da resposta inflamatória hepática.

Palavras-chave: Fígado. Metabolismo energético. Inflamação. Glicocorticóides. Melatonina.

ABSTRACT

RODRIGUES, S. C. **Effects of pinealectomy and blockade of signaling by glucocorticoid receptor on the metabolic and inflammatory liver fuctions.** 2015. 107 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Circadian biological rhythms guarantee the temporal relationship between living beings and the environment. Metabolic regulation relates to the rhythm to the light-dark cycle, with importance of the actions of melatonin and glucocorticoids in the liver. We investigated the role of glucocorticoids in the metabolic adjustment mediated by rhythmic secretion of melatonin and in the liver inflammatory context. Male *Wistar* rats pinealectomized treated or not with RU 486 had the circadian levels of circulating corticosterone, insulin and glucose measured along 8 ZTs. At ZT 10, we analyzed mRNA and protein expression related to metabolic and inflammatory actions. Our results from *in vivo* tests to glucose and pyruvate tolerance, glucose stimulated insulin secretion (GSIS) and evaluation in liver of p-AKT stimulated at ZT10, along with the changes on body composition, glycogen content and liver histology, indicate influence of corticosterone signaling on glucose metabolism and insulin response in liver, as well as correlation of melatonin and glucocorticoids effects in energy metabolism and in the modulation of inflammatory response in liver.

Keywords: Liver. Energy metabolism. Inflammation. Glucocorticoids. Melatonin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os ritmos biológicos circadianos constituem uma estratégia adaptativa que garante a relação temporal entre os seres vivos e seu meio ambiente, em geral sincronizada pelo ciclo claro-escuro do dia e da noite. Para isso, a temporização circadiana organiza os processos fisiológicos e comportamentais para que diferentes órgãos e sistemas operem de forma adaptada à fase do dia, com variações qualitativas e quantitativas que garantem a perfeita relação temporal entre os seres vivos e seu ambiente e, por extensão, a sobrevivência individual e da espécie. Assim, a sinalização do ciclo claro-escuro ao organismo é fundamental para a regulação da maioria das funções inerentes à sobrevivência de um animal, posto que modifica padrões hormonais, metabólicos e comportamentais do indivíduo. Diversas funções do organismo, como a reprodução, freqüência cardíaca, função renal, motilidade intestinal, ciclos de sono-vigília, fenômenos de torpor e hibernação, dentre outros, apresentam regulação cíclica (BOYCE; BARRIBALL, 2010).

Sabe-se que processos rítmicos associados ao balanço energético e suas alterações metabólicas resultantes variam sazonalmente de acordo com a disponibilidade de alimentos, ciclos reprodutivos sazonais, migratórios, etc. (SCOTT; GRANT, 2006). Uma das estratégias mais importantes, filogeneticamente selecionada nos vertebrados para garantir a sincronização dos processos rítmicos fisiológicos e comportamentais com o meio ambiente, foi a de acoplar - independentemente das características de atividade da espécie - a secreção de melatonina pela glândula pineal ao período da noite, de forma dependente da duração deste período. Dessa forma, para os vertebrados, a produção de melatonina adquire a característica funcional de representar e sinalizar para o meio interno (pela sua maior ou menor concentração plasmática) se é noite ou dia no meio exterior, além de sinalizar, por meio da duração do episódio secretório, a duração da noite externa e a estação do ano (REITER, 1993).

A organização do sistema de temporização circadiana depende de um oscilador central, localizado nos núcleos supraquiasmáticos hipotalâmicos (NSQ), que através de sinais neurais e humorais sinaliza à pineal o grau de luminosidade

ambiental e também controla os relógios periféricos localizados em todos os órgãos e tecidos efetores.

Vários fatores participam da sinalização claro-escuro, porém os mais evidentes sob o ponto de vista endócrino são, além da melatonina na fase de escuro, a ação dos hormônios corticosterona e cortisol na fase de claro, os glicocorticóides ativos na maioria dos mamíferos e na espécie humana, respectivamente.

Os hormônios glicocorticóides são esteróides, produzidos a partir do colesterol, na zona fasciculada e reticular do córtex das glândulas adrenais. O colesterol provém de ésteres de colesterol armazenados na célula, e que provem de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que circulam no sangue, ou da síntese *de novo* a partir do acetato nas glândulas adrenais (ORTH; KOVACS, 1998). Exercem um papel importante em vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse.

A concentração de glicocorticóide circulante é regulada através do ajuste do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, influenciado por fatores como o ritmo circadiano (BRADBURY et al., 1991), estresse (MAKINO; HASHIMOTO; GOLD, 2002) e o *feedback* negativo (LAUGERO, 2004); este último fator é exercido pelo próprio glicocorticóide, agindo sobre os receptores glicocorticóides (GR), presentes no hipotálamo e na hipófise.

Devido à sua natureza química, os glicocorticóides circulam ligados a proteínas plasmáticas e se difundem através da membrana plasmática da célula alvo, ligando-se aos receptores de glicocorticóides no citoplasma. Os complexos hormônio-receptor formados são translocados ao núcleo onde se ligam a regiões específicas do DNA, os elementos de resposta aos glicocorticóides (Figura 1). Essa ligação estimula ou inibe eventos de transcrição do gene-alvo, dando-se através das flutuações nos níveis protéicos resultantes desse processo os efeitos biológicos dos glicocorticóides (CONSIDINE, 2005).

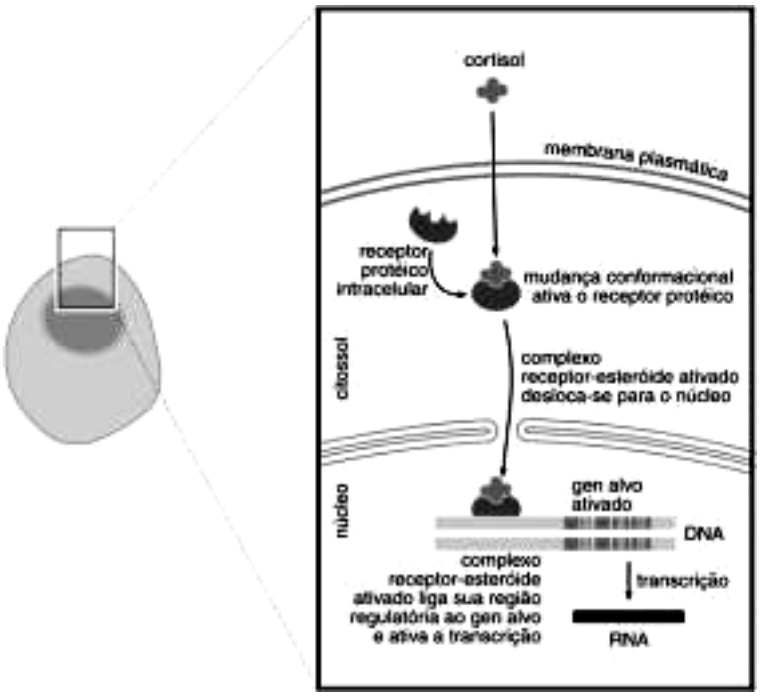

Figura 1: O cortisol, produzido pelas glândulas supra-renais humanas, é um sinalizador hidrofóbico que forma um complexo receptor ligante, entrando no núcleo, onde vai ativar a transcrição de genes.

Farmacologicamente, a sinalização dos glicocorticóides pode ser bloqueada com o fármaco RU 486 ou mifepristona (Figura 2). O RU 486 é um antagonista de receptor de progesterona que, em altas concentrações, provoca um bloqueio do GR (FLESERIU et al., 2012), mas não dos receptores de mineralocorticóides (CASTINETTI; CONTE- DEVOLX; BRUE, 2010).

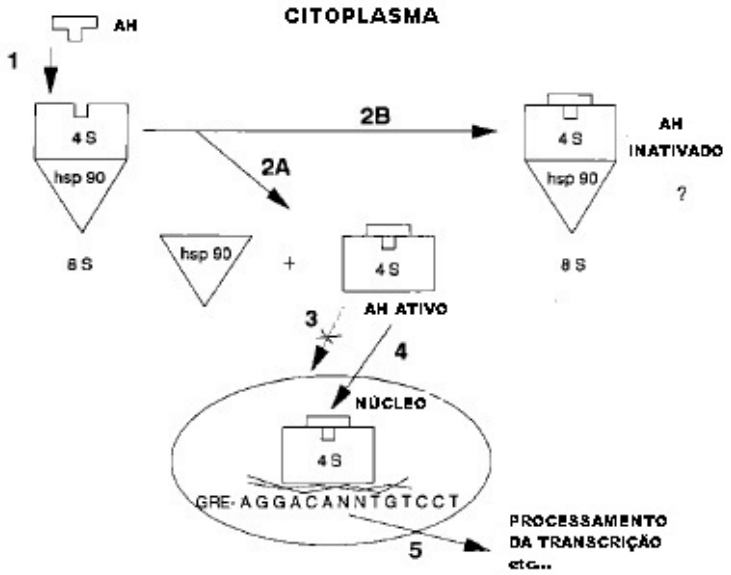

Figura 2: Mecanismo de ação de um anti-hormônio. AH: anti-hormônio. Modificada de MAO; REGELSON; KALIMI, 1992.

Os glicocorticóides são sinalizadores do início do período diurno em animais cujo período ativo é o dia (inclusive em humanos) e de importante participação no início do ciclo de vigília, sendo bem conhecido o pico de cortisol matinal em humanos (WEITZMAN et al., 1971). Já em animais cujo período ativo é o noturno, o que se nota é a existência do pico de glicocorticóide no início da noite, de modo compatível aos hábitos noturnos da espécie (FULLER; GOOLEY; SAPER, 2006).

Nos mamíferos, a pineal não apresenta característica de órgão fotoreceptor como em outras espécies animais em que a luz inibe diretamente a produção de melatonina. O controle dos ciclos ambientais de iluminação sobre a produção de melatonina nos mamíferos se dá de forma indireta, por projeções retinianas para estruturas diencefálicas e destas para os neurônios pré-ganglionares que, através da inervação simpática periférica, inervam a glândula pineal (BARTOL et al., 1997; CIPOLLA-NETO et al., 1995; CIPOLLA-NETO et al., 1999; RIBEIRO-BARBOSA et al., 1999).

Dessa forma, a melatonina pode regular e sincronizar, circadiana e sazonalmente, processos fisiológicos vitais como atividade e repouso, sono e vigília, processos reprodutivos, secreções hormonais e a aquisição, armazenamento, consumo e preservação de energia e, conseqüentemente, todos os processos envolvidos na regulação do metabolismo energético.

1.2 CONTROLE DO METABOLISMO ENERGÉTICO

Ao longo do desenvolvimento evolutivo, podemos observar em diversos animais plesiomórficos em relação aos mamíferos, incomum disposição anatômica dos órgãos dos sistemas fisiológicos. Por exemplo, em crustáceos, o hepatopâncreas concentra funções de pâncreas endócrino, pâncreas exócrino e fígado num só órgão.

Quanto aos órgãos envolvidos no controle do metabolismo, é possível verificar de maneira clara a intersecção entre função e disposição anatômica dos órgãos (com circulação associada) em várias espécies animais, inclusive no humano, em que a circulação porta-hepática permite íntima e privilegiada sinalização entre sistema digestivo e glândulas associadas. Em mamíferos, como nesta tese estudados, a concentração no pâncreas de funções exócrinas (no sistema digestório) e endócrinas demonstra quão regulada precisa ser a secreção de

hormônios controladores do metabolismo de acordo com o tipo e quantidade de alimentos ingerida. De modo geral, em todos os órgãos animais, a fina comunicação entre o tecido que os perfaz e os sistemas circulatório e nervoso locais permitem a adequação entre a função do órgão ao *status* sistêmico do organismo.

A insulina, principal hormônio pancreático, tem diversas ações bem conhecidas sob o metabolismo hepático de mamíferos, estimulando a captação de glicose e seu armazenamento na forma de glicogênio bem como sua utilização como substrato para lipogênese. Pode também aumentar o fluxo da via glicolítica e via das pentoses, inibindo glicogenólise, gliconeogênese e formação de corpos cetônicos. Tais efeitos se devem principalmente à ativação da glicoquinase (Gck) e da glicogênio sintase (Gys), bem como a inibição de enzimas de ação antagônicas a estas, como glicose-6-fosfatase (G6pc) e glicogênio fosforilase (CHEATHAM; KAHN, 1995).

A manutenção da homeostase da glicose em todo o corpo é dependente de uma resposta secretora apropriada de insulina pelo pâncreas e da sensibilidade apropriada dos tecidos aos efeitos da hiperinsulinemia e hiperglicemia, de modo a aumentar a absorção de glicose (BAJAJ; DEFRONZO, 2003). Por sua vez, os efeitos combinados de insulina e hiperglicemia para promover a utilização de glicose dependem fortemente de dois mecanismos acoplados: (1) a supressão da produção hepática de glicose (PHG) e (2) a estimulação da captação de glicose por tecidos periféricos, principalmente o muscular (DEFRONZO, 1997; MANDARINO et al., 2001). A captação de glicose pelo tecido é regulada pelo fluxo através de duas grandes vias metabólicas: a glicólise (que representa cerca de 90% da oxidação da glicose) e a síntese de glicogênio (BAJAJ; DEFRONZO, 2003).

1.3 METABOLISMO HEPÁTICO

Por sua vez, o fígado, órgão alvo deste estudo, além de ser considerado um tecido provedor de substratos energéticos, juntamente com a musculatura e o tecido adiposo; é um dos principais tecido-alvo dos hormônios reguladores do fluxo de energia no organismo, participando ativamente do metabolismo de lipídeos, proteínas e, principalmente, do metabolismo de carboidratos (ARIAS et al., 1988).

Diversas vias bioquímicas intercelulares são continuamente ativadas e desativadas no fígado, muitas garantem a regulação de processos centrais do

metabolismo energético, tais como glicólise, gliconeogênese e glicogenólise. Além de serem regulados pelo fígado esses eventos metabólicos ocorrem também neste órgão e estão diretamente ligados a distúrbios e patologias associadas como síndrome metabólica, diabetes, obesidade, etc.

A insulina e glucagon pancreáticos atingem o fígado via circulação porta e influenciam diretamente a homeostase energética sistêmica através de suas ações hepáticas. O glucagon previne a hipoglicemia por estimular uma produção de glicose à taxa suficiente para prover o sistema nervoso central (SNC) além de outras necessidades de glicose, como as geradas por exercício muscular, que diminuem reciprocamente os níveis de insulina, sendo que um declínio na taxa insulina/glucagon promove glicogenólise hepática (UNGER; DOBBS; ORCI, 1978).

Sob condições anabólicas, a insulina estimula a síntese de glicogênio ativando simultaneamente glicogênio sintase e inibindo de glicogênio-fosforilase (DENT et al., 1990). Este efeito da insulina é mediado através da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K), que inativa quinases tais como glicogênio sintase quinase 3 e ativa fosfatases, como fosfatase proteíca 1 (PPI). Vários estudos demonstraram de forma convincente que os inibidores da PI 3K e da glicogênio sintase podem inibir e abolir a síntese de glicogênio (SALTIEL; KAHN, 2001).

Do ponto de vista fisiológico, faz sentido que a ativação do transporte de glicose e da glicogênio sintase estejam ligadas a um mesmo mecanismo de sinalização, a fim de proporcionar uma estimulação coordenada e eficiente do metabolismo da glicose intracelular (BAJAJ; DEFRONZO, 2003).

Quando o glicogênio hepático é deplatado, baixo níveis de insulina liberam aminoácidos a partir da proteína muscular (MARIISS et al., 1971) e ácidos graxos livres a partir de triglicérides (MCGARRY; FOSTER, 1977) que provêm ao fígado substratos para gliconeogênese e ketogênese. Glucagon, por sua vez, promove tanto gliconeogênese quanto ketogênese no fígado. A combinação de baixa insulina com alto glucagon promove duas mudanças vitais: (1) provê o fígado de precursores energéticos e, (2) aumenta as capacidades gliconeogênica (EXTON; PARK, 1969) e de ketogênese (MCGARRY; WRIGHT; FOSTER, 1975) hepáticas. Com a produção de cetona subindo, esta está cada vez mais presente no SNC, como substrato energético alternativo à glicose, o que diminui a gliconeogênese e economiza proteínas, talvez um mecanismo adaptativo crucial para o prolongamento da sobrevivência no jejum (CAHILL, 1971).

Similarmente, durante exercício extenuante, com alta utilização de glicose pelos músculos (VRANIC; WRENSHALL, 1969), haverá um aumento marcante da produção de glicose hepática (VRANIC; KAWAMORI; WRENSHALL, 1974; VRANIC et al., 1976), em grande parte glucagon-mediada (GALBO; HOLST; CHRISTENSEN, 1975; GANDA et al., 1977), que previne a hipoglicemia e provê ajuste vital na sobrevivência durante situações de “luta- ou- fuga”.

Além disso, após uma noite de jejum (estado pós-absortivo), a maior parte da utilização total de glicose ocorre em tecidos independentes da insulina, cerca de 50% no cérebro e 25% na área esplênica (fígado e tecidos gastrointestinais). A utilização basal de glicose, que na média é de aproximadamente 2,0 mg/kg/min, precisamente correspondente à liberação basal de glicose pelo fígado (BAJAJ; DEFRONZO, 2003).

Após a ingestão de uma refeição contendo glicose, a maior parte (cerca de 80% a 85%) tem utilização no tecido muscular. A manutenção da homeostase da glicose é dependente de três processos intimamente relacionados: (1) de secreção de insulina pelas células β pancreáticas, (2) a estimulação da captação de glicose pelos tecidos esplênicos (fígado e intestino) e periféricos (principalmente muscular), e (3) a supressão da produção de glicose hepática. Embora o tecido adiposo seja responsável por apenas uma pequena quantidade de utilização de glicose total do corpo (4% a 5%), ele desempenha um papel muito importante na manutenção da homeostase da total de glicose do corpo (BAJAJ; DEFRONZO, 2003).

A chamada resistência hepática a insulina (RHI) pode ser bem exemplificada em estados patológicos como o diabetes tipo II, em que ocorre elevação na PHG mesmo com leve a moderada hiperinsulinemia de jejum, sendo o grau do acréscimo na PHG basal intimamente correlacionado ao grau de hiperglicemia em jejum (DEFRONZO et al., 1985; DEFRONZO; FERRANNINI; SIMONSON, 1989; DEFRONZO, 1997). Assim sendo, quando há RHI, o fígado, enquanto tecido-alvo da insulina, perde sua capacidade de responder apropriadamente ao estímulo hormonal, em condições euglicêmicas, o que também pode acontecer com a musculatura e tecido adiposo.

Tendo em vista que a hiperinsulinemia é um potente inibidor de PHG (CHERRINGTON, 1999), a resistência hepática à ação da insulina deve estar presente no estado pós-absortivo para explicar a produção excessiva de glicose pelo fígado. A hiperglicemia *per se* também exerce uma ação supressiva poderosa sobre

a PHG (DEFRONZO et al., 1983). Por isso, também deve haver resistência à glicose no que diz respeito ao efeito inibitório da hiperglicemia na PHG, e esta tem sido bem documentada (MEVORACH et al.,1998).

Sabe-se hoje que o controle do fígado sobre o metabolismo também está sob a influência de vários outros fatores, por exemplo, a microbiota intestinal, que recentemente vem sendo apontada por desempenhar um papel importante na manutenção da saúde do fígado e suas funções homeostáticas (LAU; CARVALHO; FREITAS, 2015).

A relação anatômica e funcional entre intestino e fígado, também através da circulação portal, possibilita que o fígado receba cerca de 70% do seu aporte sanguíneo a partir do intestino, o que favorece influências bidirecionais e, assim, representa a primeira linha de defesa contra os antígenos derivados do intestino (COMPARE et al., 2012).

Devido a este *link* com o intestino, o fígado é constantemente exposto a produtos bacterianos derivados do órgão. As células imunes, como as células de *Kupffer* (macrófagos) reconhecem padrões moleculares associados a agentes patogênicos moleculares (APMs) através de receptores de reconhecimento de padrões, por exemplo, os receptores de tipo *Toll* (TLR), desempenhando assim um papel importante na proteção sistêmica bacteriana (MENCIN; KLUWE; SCHWABE, 2009).

Estudos clínicos em mulheres com dietas controladas nas quais os níveis de colina foram variáveis, mostraram relação entre níveis de *Gammaproteobacteria* e *Erysipelotrichiwere* diretamente relacionados às alterações na gordura do fígado durante a depleção de colina. (SPENCER el al., 2011) Além disso, de maneira independente da obesidade, um estudo recente demonstrou que a flora intestinal marcadamente impacta o metabolismo dos lipídeos no fígado (LE ROY et al., 2013), podendo, inclusive, causar injúria hepática com fibrose do tecido, como visto em alguns experimentos envolvendo transplante de microbiota em camundongos (DE MINICIS et al., 2014).

1.4 GLICOCORTICÓIDES E O METABOLISMO ENERGÉTICO

Os hormônios glicocorticóides corretamente secretados e circadianamente regulados são cruciais para o pleno controle sistêmico do metabolismo energético ao longo do dia e variações sazonais ambientais.

Os glicocorticóides estimulam a mobilização de proteínas para disponibilizar aminoácidos para a gliconeogênese, diminuindo síntese proteica e aumentando a proteólise (DARMAUN; MATTHEWS; BIER, 1988), além de ativar enzimas gliconeogênicas, exercendo assim um importante papel na manutenção da glicemia durante o jejum. Em situações extremas, em que ocorre ausência de glicocorticóides, a proteólise pode não ser suficientemente ativada podendo causar coma glicêmico e morte.

Em excesso os glicocorticóides também podem ser prejudiciais, acarretando em hiperglicemia, pois sua função é antagônica à da insulina. Nessas condições, inclusive, pode inibir sua secreção, assim como à captação de glicose pelo músculo e tecido adiposo. Tal efeito anti-insulínico parece ocorrer tanto ao nível do receptor de insulina como em etapas posteriores (GENUTH, 1993).

1.5 REGULAÇÃO CIRCADIANA DO METABOLISMO ENERGÉTICO

É principio fundamental que todos os seres vivos mantenham uma relação adequada entre a aquisição, armazenamento e o consumo energético, de modo a garantir sua sobrevivência. Para os animais é absolutamente necessário que o período de procura de alimento seja otimizado de forma a estar de acordo com o período circadiano de atividade da espécie e também perfeitamente sincronizado com o momento do dia em que a probabilidade de aquisição energética é a maior possível.

Nos mamíferos, o processo de aquisição energética tem condicionantes mais complexos e a sua expressão rítmica circadiana não está estritamente alocada ao dia ou à noite em todas as espécies, mas sim ao surto diário de atividade típico da espécie, isso de modo dependente da história filogenética da espécie e seu nicho ecológico. Dessa forma, de acordo com as adaptações particulares de cada espécie, as funções metabólicas se modificam circadianamente de acordo com o período de atividade/aquisição energética e o período de repouso/jejum.

Tendo em vista que a aquisição energética é condição absoluta para a manutenção da vida, é compreensível que fatores sinalizadores intrínsecos do estado metabólico do organismo (como glicemia, insulinemia, níveis dos estoques energéticos, sinalizadores da presença de nutrientes no trato gastrointestinal, etc.) devam também, paralelamente aos sincronizadores circadianos clássicos, regular e sincronizar a própria expressão rítmica circadiana da atividade e do repouso e, em particular, dos processos de aquisição, armazenamento, consumo e preservação de energia.

No contexto deste trabalho, a melatonina pode alterar o metabolismo energético de acordo com períodos ambientais específicos e assim alterar a utilização de glicose e outros substratos energéticos.

A importância da melatonina na regulação hepática da homeostasia energética já foi explorada por nós e por outros grupos. É sabido que o fígado é órgão-chave da manutenção da glicemia dentro de uma faixa estreita, função esta desempenhada por (a) sua capacidade metabólica direta de liberar glicose na circulação pela glicogenólise e a gliconeogênese e (b) pela sua função endócrina de secretar uma substância sensibilizadora à insulina (*hepatic insulin sensitizing substance*- HISS).

As flutuações circadianas das atividades metabólicas do fígado são bem conhecidas. O ritmo circadiano da produção hepática de glicose e da expressão de fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no fígado de ratos apresenta-se variável de acordo com a oscilação diária da ativação nervosa autonômica e do comportamento alimentar (CAILOTTO et al., 2005; CAILOTTO et al., 2008). Também já foi demonstrado aumento da glicemia e redução dos níveis de melatonina noturna em indivíduos diabéticos (RADZIUK; PYE, 2006).

Nesse sentido, nosso grupo demonstrou que a ausência de melatonina provocada pela retirada cirúrgica da glândula pineal, ou pinealectomia, também diminui a produção hepática de proteína morfogênica óssea 9 (BMP9), um forte candidato a desempenhar o papel da HISS (CAPERUTO et al., 2008). Além disto, também observamos que a capacidade metabólica do fígado é modulada pela ausência de melatonina à medida que a pinealectomia desencadeia um estresse de retículo endoplasmático (RE) noturno no tecido hepático, como descrito detalhadamente a seguir.

Nestes animais, a pinealectomia desencadeou um quadro de resistência hepática noturna à insulina, caracterizada pela redução da fosforilação da proteína

quinase B (AKT) e aumento da expressão de PEPCK no período escuro. Estas alterações foram suprimidas pela reposição com melatonina.

A pinealectomia promoveu o aumento noturno de vários marcadores do estresse de RE, como *activating transcription fator* 4 e 6 (ATF4 e 6), proteína chaperone de ligação, (BiP) e *CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein* (CHOP), induzindo um ritmo circadiano de expressão destas proteínas, que estavam ausentes no fígado de animais intactos ou pinealectomizados tratados com melatonina. Proteínas que medeiam a resistência hepática à insulina induzidas pelo estresse do RE, como *tribble 3 protein* (TRB3), *regulatory-associated protein of mTOR* (RAPTOR) e *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (RICTOR), também estavam aumentadas no fígado de animais pinealectomizados apenas durante o período noturno; tal alteração também foi revertida pela reposição de melatonina.

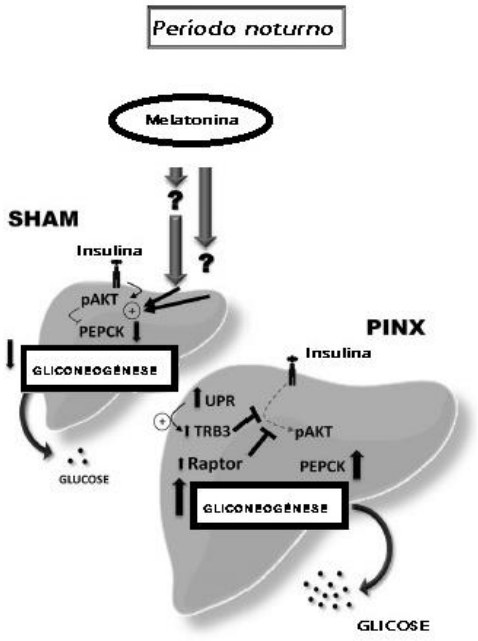

Figura 3: Diagrama representando o modelo proposto de resistência a insulina durante o período noturno no fígado de ratos pinealectomizados (PINX). Modificada de NOGUEIRA et al., 2011.

Este foi o primeiro estudo que relatou alterações circadianas nas vias de sinalização ativadas pelo estresse de retículo endoplasmático relacionadas à ausência de melatonina e à resistência insulínica noturna (NOGUEIRA et al., 2011).

Um aspecto central das ações da melatonina sobre o metabolismo de carboidratos é que a pinealectomia promove aumento de duas vezes nos níveis de glicocorticóides circulantes. Esse efeito foi consistentemente observado em ratos pinealectomizados em três períodos do dia (às 8, 14 e 23 h), porém com manutenção do padrão de ritmicidade circadiana (ALONSO-VALE et al., 2004).

Estudos clássicos demonstraram que melatonina e pinealectomia têm ação modulatória sobre as glândulas adrenais (HEIMAN; PORTER, 1980; OXENKRUG; MCINTYRE; GERSHON, 1984). Entretanto, é amplamente conhecido que os glicocorticóides são potentes estimuladores da produção hepática de glicose. Até o momento não está esclarecido se os efeitos da melatonina sobre a regulação da produção hepática de glicose são diretos ou dependentes da ação dos glicocorticóides.

Tendo em vista que muitas das alterações metabólicas hepáticas observadas em animais pinealectomizados podem ser devidas ao reajuste da secreção e ação de glicocorticóides nestes animais, faz-se importante a elucidação da real participação desses hormônios nos eventos controladores do metabolismo energético hepático.

Nesta investigação visamos esclarecer se as principais alterações metabólicas energéticas observadas na pinealectomia e relatadas na literatura, geralmente no contexto de ausência e reposição de melatonina, não poderiam, na verdade, decorrer diretamente de um fator endócrino potencialmente mais atuante, pelos próprios efeitos clássicos sobre seus tecidos-alvo e através de seu principal mecanismo: sinalização intracelular via GR.

1.6 HOMEOSTASIA GLICÊMICA, ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO HEPÁTICA

Várias comorbidades conhecidas podem estar associadas à inflamação hepática, por exemplo: Sobrepeso visceral, hiperinsulinemia/ diabetes, hipertensão arterial e obesidade. Muitos destes são decorrentes principalmente do aumento crônico da glicemia.

É sabido que a doença hepática gordurosa não alcóolica (DHGNA), condição clínico-patológica presente na esteatose, esteatohepatite e uma série de formas mais graves de doenças hepáticas como a cirrose e carcinoma (LEVENE; GOLDIN,

2012) é parte da síndrome metabólica e presente em indivíduos que sofrem de diabetes mellitus tipo II, obesidade e dislipidemia (POWELL et al., 1990). Na patogênese da DGHNA, a resistência à insulina parece desempenhar papel fundamental (TARANTINO et al., 2007), sendo a progressão da doença normalmente associada ao estresse oxidativo e à sinalização inflamatória pelo tecido adiposo, culminando na forma inflamatória da patologia, a esteatohepatite (CORTEZ-PINTO; DE MOURA; DAY, 2006).

Embora atualmente não haja tratamento estabelecido para DHGNA, a maioria das estratégias terapêuticas tem como alvo a melhoria da resistência à insulina (RI), enquanto mecanismo fisiopatológico subjacente mais importante da DHGNA e da esteatose não alcoólica (ENA) (BUFIANESI; MCCULLOUGH; MARCHESINI, 2005).

A ligação entre resistência à insulina e DHGNA é bem conhecida e, a respeito, se destacam mudanças nos mecanismos que levam ao início e à progressão da doença pela sinalização da insulina alterada. O metabolismo lipídico alterado devido a resistência a insulina gera intermediários lipídicos que podem ativar diferentes quinases: *Mammalian target of rapamycin* (mTOR), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) e proteína quinase C original (nPKC) (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008). A ativação dessas quinases tem efeito de *feedback* negativo sobre a sinalização de insulina, contribuindo para a resistência a insulina e para o estado hiperinsulinêmico, que aumenta a liponeogênese *de novo* e piora o acúmulo de lipídios no fígado (ASRIH; JORNAYVAZ, 2013).

Sob o ponto de vista hormonal, já foi demonstrado que animais depletados de melatonina apresentam aumento de proteínas relacionadas à resistência hepática a insulina via estresse de RE, como TRB3 (NOGUEIRA et al., 2011). Segundo Du et al. (2003), o aumento de TRB3 no fígado de ratos resulta em hiperglicemia e inativação da AKT, conhecida por inibir a morte celular programada, a apoptose.

Independentemente do motivo que provoca a hiperglicemia crônica e a RI, se parte da adaptação metabólica gestacional como visto em ratas prenhes a termo (RODRIGUES et al., 2014), estas aceleram o processo de estresse oxidativo, que, por sua vez, acelera a glicação avançada, gerando um grupo heterogêneo de substâncias conhecidas como produtos finais da glicação avançada (AGEs).

Níveis elevados de intermediários reativos conhecidos como α-dicarbonilas ou oxoaldeídos formam a maior parte dos AGEs *in vivo* (DEGENHARDT, THORPE; BAYNES, 1998), que se acumulam no meio intracelular e ativam vias de sinalização

envolvendo várias funções proteicas. Essas vias podem ser ativadas de modo dependente ou independente do receptor de produtos finais da glicação avançada-RAGE (GOH; COOPER, 2008).

A glicação avançada se dá ao longo de um período prolongado de tempo e afeta proteínas de baixa taxa de renovação, como componentes da membrana basal (colágeno IV), miosina, tubulina, fibrinogênio (VLASSARA, 1996) e componentes da matriz extracelular (DEGENHARDT; THORPE; BAYNES, 1998), que resultam, por fim, nas alterações estruturais provocadas por AGEs, como o que ocorre no diabetes. Tal processo se dá através do decorrente aumento de rigidez protéica, da resistência à digestão proteolítica, do aumento de proteínas de matriz extracelular e maior expressão de citocinas como o fator de crescimento transformador β (TGF β) (FORBES et al., 2003; THROCKMORTON et al., 1995).

Na ocorrência da ligação de RAGE com AGEs há ativação de segundos mensageiros intracelulares, como a proteína quinase C (PKC) e diacilglicerol que têm como alvo final o fator nuclear *kappa* B (NFkB), que é translocado ao núcleo onde ativa transcrição proteica específica, incluindo citocinas pró-inflamatórias (GOLDIN et al., 2006; SCHIEKOFER et al., 2003), sendo que a região promotora do receptor (RAGE) contem elementos de ligação ao NF-κB (LI; SCHMIDT, 1997).

Sabe-se que ligação AGE-RAGE nas células endoteliais, por exemplo, pode desencadear vários distúrbios nas funções celulares e ativar vias envolvendo: (a) NADPH oxidase, (b) geração de espécies reativas e oxigênio e (c) proteínas quinase de ação mitogênica (MKPs) (SCHMIDT; STERN, 2000).

Ainda, o aumento da concentração de glicose intracelular pode gerar inflamação pela via dos polióis, em que a aldose redutase reduz aldeídos a álcoois inativos na célula. Essa enzima possui baixa afinidade pela glicose e em níveis normoglicêmicos é pouco ativada, porém, em hiperglicemia duradoura, a aldose redutase também reduz o sorbitol, que posteriormente é oxidado à frutose, num processo que consome NADPH, essencial na redução da glutationa reduzida, importante antioxidante. O resultado é maior suscetibilidade da célula ao estresse oxidativo num contexto pró-inflamatório (ENGERMAN; KERN; LARSON, 1994).

Além disso, desempenha papel crucial na inflamação hepática os mediadores inflamatórios que normalmente estão envolvidos em cascatas de sinalização relacionadas à inflamação, à fibrose e até à tumorgênese. Nesse contexto, os direcionadores do ritmo de progressão da inflamação são: *Status* imune do

organismo, estresse de retículo endoplasmático, citocinas e outros sinalizadores em tecidos extra-hepáticos (TILG; MOSCHEN, 2010).

O fator alfa de necrose tumoral (TNF) também é capaz de dirigir a transdução de sinal para uma resposta apropriada aos diferentes estímulos devido à sua capacidade de se ligar aos seus receptores tipo 1 e 2 e assim controlar as ações induzidas na célula (SCHWABE; BRENNER, 2006). Após a ligação do TNF aos seus receptores, ambos os tipos recrutam moléculas TNF-R1, *associated death domain* protein (TRADD), *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2) e *receptor-interacting protein kinases* (RIP) para ativar as vias de sinalização da IKK e JNK, relacionadas a mecanismos anti-apoptóticos e a proliferação. A indução da apoptose pode ocorrer via Caspase 8 (Figura 4).

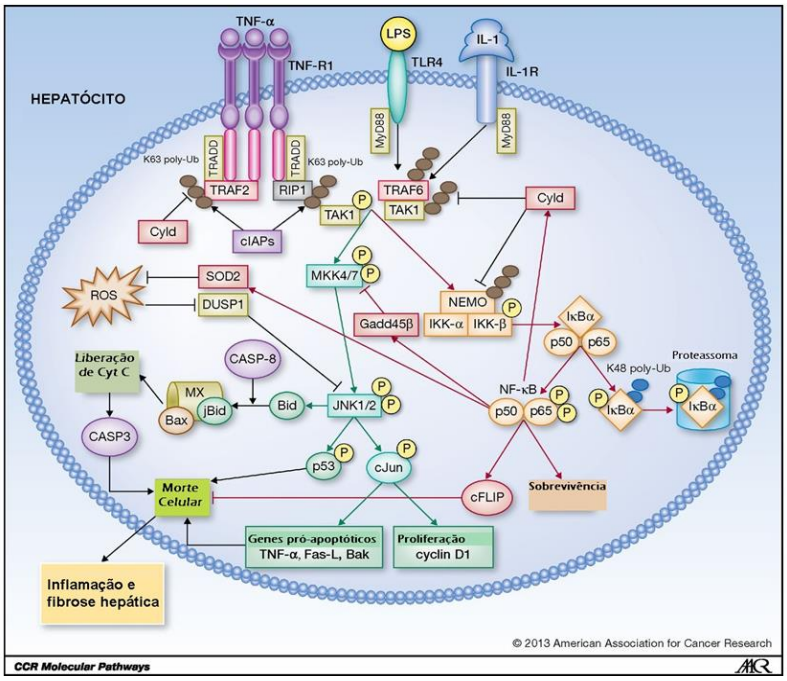

Figura 4: Regulação da morte celular e proliferação no fígado através das vias da NF-κB e JNK. Modificada de NIKOLAOU; SARRIS; TALIANIDIS, 2013.

Complexos proteicos montados com os ligantes de TNF, receptores do tipo *Toll* e receptores de IL1 medeiam a ativação da *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7* (TAK 1), cuja atividade é modulada por cylindromatosis (Cyld). TAK1 fosforila IKK β, que por sua vez fosforila a IkB, que conduz à sua degradação e libertação do NF-κB (p50- p65) mediada por fatores ubiquitina- proteassoma. NF-κB, por sua vez, é translocado ao núcleo para ativar a transcrição de genes pró-sobrevivência e induz a expressão de *celullar caspase-8-like inhibitory protein*

(cFLIP) e superóxido dismutase 2 (SOD2), que inibem a apoptose e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS).

TAK1 também fosforila *mitogen-activated protein kinase kinase* 4/ 7 (MKK4/7), que ativam JNK1/ 2. A ativação rápida e transitória de JNK em curto prazo induz a expressão de genes envolvidos no controle da proliferação. Já a ativação de JNK prolongada induz a expressão de genes pró-apoptóticos e estabiliza a P53 e a via apoptótica Bax/Bak-dependente. NF-κB regula a sua própria ativação via modulação da expressão de Cyld e a ativação de JNK via ativação de expressão de *growth arrest and DNA damage-inducible protein beta* (Gadd 45β), que inibe MKK4/ 7. A ativação JNK também é modulada por acúmulo de ROS através da atividade da fosfatase 1 de dupla especificidade (DUSP 1) e caspase-3/ 8 (NIKOLAOU; SARRIS; TALIANIDIS, 2013).

1.7 GLICOCORTICÓIDES E INFLAMAÇÃO

Muitos atores do sistema endócrino têm efeitos sobre os níveis glicêmicos do organismo. Os glicocorticóides são hormônios hiperglicemiantes e que afetam muito o metabolismo lipídico, em condições fisiológicas. Assim como a melatonina, esses hormônios mostram influência sobre a melhora ou agravamento do quadro de inflamação hepática dependentemente da situação fisiológica sistêmica em que estão inseridos.

Os glicocorticóides são hormônios essenciais à vida, sendo a sobrevivência na ausência das glândulas adrenais e sem reposição hormonal limitada a poucos dias. Além de atuar na produção de glicose a partir de proteínas e facilitar o metabolismo das gorduras, os glicocorticóides afetam profundamente o sistema imune, exercendo grande influência sobre o complexo conjunto de reações ao traumatismo tecidual, infecção ou proteínas estranhas (GENUTH, 1993).

Os hormônios cortisol, corticosterona e todos os glicocorticóides sintéticos inibem fortemente a reação imune local imediata à lesão tecidual, através da inibição de ações coordenadas por prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, óxido nítrico (NO) e fator ativador de plaquetas que normalmente atuam no aumento da permeabilidade microvascular para permitir maior infiltração de leucócitos e por isso tem grande aplicação terapêutica (CATO; WADE, 1996).

A inibição dessas reações pelo cortisol se deve pela supressão da síntese e liberação do ácido araquidônico, precursor de muitos mediadores imunes pró-inflamatórios e indução de lipocortina, que inibe a fosfolipase A_2 (libera o ácido araquidônico de sua ligação com a fosfatidilcolina) sendo a produção de ácido araquidônico pela fosfolipase A_2 limitante do processo de síntese de prostaglandinas, leucotrieno e tromboxanos (PERRS; FLOWER, 1990). Ademais, os glicocorticóides estabilizam os lisossomos e assim reduzem a liberação local de enzimas proteolíticas e de hialuronidase, que contribuem localmente para a formação de edema, também reduzem a expressão dos genes que codificam a cicloxigenase 2 (que atua na síntese de prostaglandinas na direção dos produtos inflamatórios) e a sintase do óxido nítrico (NOS) (ALLISON; LEE, 1989).

Sobre os tipos celulares, sabe-se que cortisol pode ainda inibir a diferenciação e proliferação de mastócitos inflamatórios locais. O cortisol inibe o recrutamento dos leucócitos humanos a partir dos vasos sanguíneos, diminuindo sua marginalização e adesão ao endotélio capilar via inibição da produção e fixação dos receptores específicos nas células endoteliais e dos peptídeos quimiotáxicos que atraem esse tipo celular (CALVANO et al., 1987). Além disso, o cortisol também inibe atividade fagocítica e bactericida dos neutrófilos da mesma maneira que inibe o chamado *burst* oxidativo que acompanha esses eventos, estimulado pelos leucotrienos.

Interessantemente, o número de neutrófilos liberados pela medula óssea na corrente sanguínea aumenta apesar de sua eficácia diminuir (UMEKI; SOEJIMA; 1990), e o número de eosinófilos também parece diminuir em resposta ao cortisol via estímulo apoptótico (SCHLEIMER, 1990).

Os glicocorticóides também podem agir suprimindo um processo base da resposta inflamatória crônica a uma lesão ao provocarem impedimento da formação de paredes conjuntivas em resposta à inflamação. Os glicocorticóides diminuem a contagem de linfócitos circulantes derivados do timo (células T), devido à maior ocorrência de apoptose. Seu transporte para o local de estimulação antigênica e suas funções também são reduzidas resultando em comprometimento da imunidade mediada por células (ALLISON; LEE, 1989).

Quando um antígeno entra no organismo, é fagocitado por um macrófago que apresenta o antígeno para as células T e libera, simultaneamente, interleucina 1 (IL1) que ativa o subgrupo de células T auxiliares, que por sua vez, secretam várias interleucinas. Estas produzem cascatas de reações que geram número ainda maior

de células T ativadas e incrementam a produção de citocinas, influenciando diversas funções (GENUTH, 1993). Os glicocorticóides inibem a apresentação inicial do antígeno e a produção de IL1, IL2, IL6, interferon-γ e outros produtos de macrófagos e linfócitos, afetando muito mais as células imunes em repouso do que as que já foram ativadas previamente. A proliferação de linfócitos é inibida nos estágios da interfase G_0 e G_1 e os monócitos têm sua diferenciação a macrófagos interrompida (LANSBERG; YOUNG, 1992). As células T ativadas recrutam e ativam os linfócitos B que produzem anticorpos específicos contra os antígenos; os glicocorticóides também apresentam ação inibitória, mesmo que indireta, sobre a produção de anticorpos à medida que inibem a ativação das células T.

A atividade imune varia de acordo com o período ativo da espécie, nos humanos varia num padrão diurno oposto ao da secreção de cortisol, pois este inibe as respostas imunes; já as citocinas, por sua vez, estimulam a liberação de cortisol. Sendo assim, existe relação de *feedback* negativo entre o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e o sistema imune.

A IL1, a IL6 e o TNF estimulam o hormônio corticotropina (CRH) e conseqüentemente a secreção de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), que estimula a zona fasciculada da adrenal a produzir glicocorticóides. Adicionalmente, os genes do CRH e ACTH são expressos por algumas células imunes, podendo haver efeitos autócrinos e parácrinos sobre a resposta imune (MASTORAKOS; CHROUROS; WEBER, 1993).

TNF é uma citocina que induz respostas de proliferação, produção de mediadores inflamatórios, morte celular e executa importante ação na patogênese do choque séptico. É produzida principalmente por macrófagos, mas também por vários outros tipos de células (WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003) em resposta ao lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas (LPS); além disso, é um importante ativador de vias de sinalização intracelulares pró-inflamatórias e pró-apoptóticas.

1.8 MELATONINA E INFLAMAÇÃO

Nos últimos vinte anos, vários pesquisadores demonstraram clara interferência da melatonina nas respostas imunes do organismo (LISSONI et al., 1994; MAESTRONI, 1998; NELSON; DEMAS, 1997; REITER; GUERRERO, 2002).

Atualmente, a melatonina é conhecida por exercer importante papel na modulação das respostas inflamatórias e efeito protetor no choque séptico e hemorrágico.

A melatonina funciona como um antioxidante potente, eliminando o radical livre hidroxila e peroxinitritos- um oxidante reativo produzido a partir da reação de NO e de superóxidos (GILAD et al., 1997; REITER, 1995a; REITER, 1995b). Aumentos na produção de NO estão presentes em diversos processos patofisiológicos incluindo várias formas de choque circulatório e inflamação (NATHAN; XIE, 1994; SZABÓ, 1995). Sua produção se dá através das enzimas denominadas NOS, sintases de óxido nítrico, que convertem L-arginina em NO, este, por sua vez, desempenha funções na regulação cardiovascular (relaxamento endotelial), no sistema nervoso central e periférico (papel nos efeitos de aminoácidos excitatórios em curto prazo, bem como em longo prazo sobre o cérebro desenvolvimento, degeneração de neurônios e de células da retina, neurotransmissão, papel no efeito periférico analgésico da acetilcolina, entre outros) e em repostas imunes (ativação de macrófagos e células de *Kupffer*) e outros mecanismos de homeostasia (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A isoforma induzível de NOS (iNOS) é responsável pela produção excessiva de NO na inflamação. Esta isoforma pode ser expressa em muitos tipos de células incluindo macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, músculo liso vascular e condrócitos (NATHAN; XIE, 1994; SZABÓ, 1995), e sua expressão envolve múltiplas vias de transdução de sinal, incluindo a ativação de tirosina-quinases e translocação do NF-κB para o núcleo (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; NATHAN; XIE, 1994). iNOS pode ser induzido pelo LPS, e por citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-γ (IFN-γ). Já os glicocorticóides, a trombina e uma variedade de citocinas antiinflamatórias podem suprimir a expressão de iNOS (NATHAN; XIE, 1994; SZABÓ, 1995).

Sabe-se que a vigília forçada por trabalho noturno leva à disruptura nos ritmos circadianos por afetar a síntese e secreção de melatonina pela glândula pineal, e assim influenciar diretamente a produção de citocinas inflamatórias e o sistema imune inato (CASTANON-CERVANTES et al., 2010). Em humanos, foi relatada alteração de secreção de melatonina e cortisol em trabalhadores noturnos que interfere diretamente nos níveis de IL1β salivar (REINHARDT et al., 2012). O padrão de secreção de IL1β parece ser mantido apenas na presença do ritmo circadiano

adequado, portanto, tal padrão parece ser suscetível à mudança na secreção de melatonina pela pineal.

Efeitos imunomoduladores da melatonina foram demonstrados *in vitro* (GONZALEZ-HABA et al., 1995; MAESTRONI, 1995) e *in vivo* (PIERPAOLI, 1993). Os macrófagos e os linfócitos T auxiliares (TCD4) vêm sendo apontados como os principais alvos celulares das ações imunomoduladoras da melatonina (LISSONI et al., 1993; MAESTRONI; CONTI; LISSONI et al., 1994).

Funções da melatonina secretada por tecidos extra pineal sobre ativação de células polimorfonucleadas (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononuceladas (linfócitos e monócitos) também foram apontados no sangue (CARRILLO-VICO et al., 2004) e peritônio (MARTINS et al., 2004).

A melatonina é apontada como inibidora do NF-κB e do desencadeamento da resposta inflamatória (BENI et al., 2004; GILAD et al., 1998). A ativação do NF-κB em células monoculeadas durante a hiperglicemia do diabetes é um passo importante do desenvolvimento de complicações vasculares presentes no diabetes avançado (LISSONI et al., 1994; SZABÓ, 1995), o que parece ser decorrente de hiperglicemia crônica e/ou dos efeitos *in vivo* dos AGEs (CONTI; MAESTRONI, 1995; LISSONI et al., 1994; LISSONI et al., 1995).

Estudos diversos apresentam a idéia de que a hiperglicemia de curta duração também leva a disfunção celular endotelial (GILAD et al., 1997; MAESTRONI; CONTI; PIERPAOLI, 1987; REITER, 1995a; REITER, 1995b), ao aumento da produção de radicais livres (LISSONI et al., 1993; PIERPAOLI, 1993) e a ativação de NF-κB nas células vasculares dos músculos lisos (GILAD et al., 1997). Tais efeitos já foram observados em hiperglicemias de pequena duração, como a pós-prandial e outras induzidas experimentalmente (LISSONI et al., 1993; SZABÓ, 1995), indicando que a hiperglicemia induz vias de transdução de sinal *in vivo* que conduzem à ativação de NF-κB.

Desta maneira, hipotetizamos se seriam os glicocorticóides, modulados pela ausência de melatonina central, os principais agentes das alterações fisiológicas relacionadas ao metabolismo energético observadas na pinealectomia. Além disso, interessamo-nos se isso ocorreria através de mecanismos clássicos de ação e sinalização dos glicocorticóides.

6. CONCLUSÕES

Tomados em seu conjunto, os resultados desta tese apontam que as alterações observadas no ZT 10 em animais pinealectomizados, quanto ao metabolismo energético e a modulação da inflamação hepática, relacionam-se entre si e decorrem do aumento da corticosterona no período de transição claro-escuro. A melatonina parece influenciar a secreção de glicocorticóides no período, que age direta e conjuntamente à melatonina, nas alterações dos aspectos avaliados no ZT10.

6.1 METABOLISMO HEPÁTICO ENERGÉTICO

O aumento dos níveis circulantes de corticosterona no ZT 10 decorre da ausência de melatonina proveniente da glândula pineal.

A sinalização hormonal via receptor de glicocorticóides regula a maior parte das ações da melatonina sobre o metabolismo da glicose e a resposta hepática à insulina. Além disso, alterações relacionadas à gliconeogênese e ao estoque de glicogênio também decorrem de ação direta de glicocorticóides sobre o fígado.

As alterações observadas quanto ao metabolismo energético hepático se relacionam ao desequilíbrio no *status* transcricional de várias proteínas possivelmente indicadoras da inflamação e estresse oxidativo no tecido hepático.

6.2 INFLAMAÇÃO HEPÁTICA

Parece haver participação conjunta dos glicocorticóides e da ausência de melatonina central sobre a modulação da inflamação hepática.

Os eventos que regulam a proliferação celular e a apoptose do tecido hepático podem ser conseqüência principalmente das ações dos glicocorticóides.

REFERÊNCIAS*

ALLISON, A. C.; LEE, S. W. The mode of action of anti-rheumatic drugs. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids. **Prog. Drug. Res.**, v. 33, p. 63-81, 1989.

ALONSO-VALE, M. I.; BORGES-SILVA, C. N.; ANHE, G. F.; ANDREOTTI, S.; MACHADO, M. A.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F. B. Light/dark cycle-dependent metabolic changes in adipose tissue of pinealectomized rats. **Horm. Metab. Res.**, v. 36, n. 7, p. 474-479, 2004.

ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B.; POPPER, H. D.; SCHACHTER, D.; SHAFRITZ, D.S. **The liver: biology and pathobiology**. New York: Raven Press, 1988. 1336 p.

ASRIH, M.; JORNAYVAZ, F. R. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. **J. Endocrinol.**, v. 218, n. 3, p. 25-36, 2013.

BAJAJ, M.; DEFRONZO, R. A. Metabolic and molecular basis of insulin resistance. **J. Nucl. Cardiol.**, v. 10, p. 311-323, 2003.

BARTOL, I.; SKORUPA, A. L.; SCIALFA, J. H.; CIPOLLA-NETO, J. Pineal metabolic reaction to retinal photostimulation in ganglionectomized rats. **Brain Research**, v. 744, p. 77-82, 1997.

BENI, S. M.; KOHEN, R.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; SHOHAMI, E. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF-kappaB and AP-1. **FASEB J.**, v.18, n. 1, p. 149-151, 2004.

BOYCE, P.; BARRIBALL, E. Circadian rhythms and depression. **Aust. Fam. Physician**, v. 39, n. 5, p. 307-310, 2010.

BRADBURY M. J.; AKANA S. F.; CASCIO C. S.; LEVIN N.; JACOBSON L.; DALLMAN M. F. Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I (MR) and type II (GR) receptors in rat brain. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, n. 3, p. 133-142, 1991.

BUFIANESI, E.; MCCULLOUGH, A. J.; MARCHESINI, G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease**. Hepatology**, v. 42, p. 987-1000, 2005.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAHILL, G. F. Jr. Physiology of insulin in man (Banting Memorial Lecture). **Diabetes**, v. 20, p. 785-799, 1971.

CAILOTTO, C.; LA FLEUR, S. E.; VAN HEIJNINGEN, C.; WORTEL, J.; KALSBEEK, A.; FEENSTRA, M.; PEVET, P.; BUIJS, R. M. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: are the clock genes involved? **Eur. J. Neurosci.**, v. 22, n. 10, p. 2531-2540, 2005.

CAILOTTO, C.; VAN HEIJNINGEN, C.; VAN DER VLIET, J.; VAN DER PLASSE, G.; HABOLD, C.; KALSBEEK, A.; PEVET, P.; BUIJS, R. M. Daily rhythms in metabolic liver enzymes and plasma glucose require a balance in the autonomic output to the liver. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1914-1925, 2008.

CALVANO, S. E.; ALBERT, J. D.; LEGASPI, A.; ORGAN, B. C.; TRACEY, K. J.; LOWRY, S. F. SHIRES, G. T. ANTONACCI, A. C. Comparison of numerical and phenotypic leukocyte changes during constant hydrocortisone infusion in normal humans with those in thermally injured patients. **Surg. Gynecol. Obstet.**, v. 164, n. 6, p. 509-520, 1987.

CAPERUTO, L. C.; ANHÊ, G. F.; CAMBIAGHI, T. D.; AKAMINE, E. H.; DO CARMO BUONFIGLIO, D.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; BORDIN, S. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 6326-6335, 2008.

CARRILLO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCIA-MAURINO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine autocrine and/or paracrine substance**. FASEB J.**, v. 18, p. 537-539, 2004.

CASTANON-CERVANTES, O.; WU, M.; EHLEN, J. C.; PAUL, K.; GAMBLE, K. L.; JOHNSON R. L.; BESING, R. C.; MENAKER, M.; GEWIRTZ, A. T.; DAVIDSON, A. J. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. **J. Immunol.**, v. 185, n. 10, p. 5796-5805, 2010.

CASTINETTI, F.; CONTE-DEVOLX, B.; BRUE, T. Medical treatment of Cushing's syndrome: glucocorticoid receptor antagonists and mifepristone. **Neuroendocrinology**, v. 92, n.1, p. 125-130, 2010. CATO, A. C.; WADE, E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. **Bioessays**, v. 18, n. 5, p. 371-378, 1996.

CATO, A. C.; WADE, E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. **Bioessays**, v. 18, n. 5, p. 371-378, 1996.

CHERRINGTON, A. D. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. **Diabetes**, v. 48, p. 1198-1214, 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P. M.; AFECHE, S. C.; SCIALFA, J. H.; PERAÇOLI, A. M. The effects of lesion of thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. **Brain Research**, v. 691, p.133-145, 1995.

CIPOLLA-NETO, J.; SKOURUPA, A. L.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BARTOL, I.; MOTA, S. R.; AFECHE, S. C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; CANTERAS, N. S. The role of the retrochiasmatic area on the control of the pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, v. 69, p. 97-104, 1999.

COMPARE, D.; COCCOLI, P.; ROCCO, A.; NARDONE, O. M.; DE MARIA, S.; CARTENI, M.; NARDONE, G. Gut-liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 22, n. 6, p. 471-476, 2012.

CONTI, A.; MAESTRONI, G. J. M. The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 103-110, 1995.

CORTEZ-PINTO, H.; DE MOURA, M. C.; DAY, C. P. Non-alcoholic steatohepatitis: from cell biology to clinical practice. **J. Hepatol.**, v. 44, n. 1, p. 197-208, 2006.

DARMAUN, D.; MATTHEWS, D. E.; BIER, D. M. Physiological hypercortisolemia increases proteolysis, glutamine and alanine production. **Am. J. Physiol.**, v. 255, p. 366-373, 1988.

DE MINICIS, S.; RYCHLICKI, C.; AGOSTINELLI, L.; SACCOMANNO, S.; CANDELARESI, C.; TROZZI, L.; MINGARELLI, E.; FACINELLI, B.; MAGI, G.; PALMIERI, C.; MARZIONI, M.; BENEDETTI, A.; SVEGLIATI-BARONI, G. Dysbiosis contributes to fibrogenesis in the course of chronic liver injury in mice. **Hepatology**, v. 59, n. 5, p. 1738-1749, 2014.

DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. **Diabetes Rev.**, v. 5, p. 117-269, 1997.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; HENDLER, R.; FELIG, P.; WAHREN, J. Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia. **Diabetes**, v. 32, p. 35-45, 1983.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; SIMONSON, D. C. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic

glucose production and impaired tissue glucose uptake. **Metabolism**, v. 38, p. 387-395, 1989.

DEFRONZO, R. A.; GUNNARSSON, R.; BJORKMAN, O.; OLSSON, M.; WAHREN.J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 76, p. 149-155, 1985.

DEGENHARDT, T. P.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. **Cell Mol. Biol.**, v. 44, n. 7, p. 1139-1145, 1998.

DENT, P.; LAVOINNE, A.; NAKIELNY, S. CAUDWELL, F. B.; WATT, P.; COHEN, P. The molecular mechanisms by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle. **Nature**, v. 348, p. 302-307, 1990.

ENGERMAN, R. L.; KERN, T. S.; LARSON, M. E. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. **Diabetologia**, v. 37, n. 2, p. 141-144, 1994.

EXTON, J. H.; PARK, C. R. Control of gluconeogenesis in liver. Effects of L-lactate, pyruvate, fructose, glucagon, epinephrine, and adenosine 3',5'-monophosllhate on gluconeogenic intermediates III the perfused rat liver. **Biol. Chem.**, v. 244, p. 1424-1433, 1969.

FLESERIU, M.; BILLER, B. M.; FINDLING, J. W.; MOLITCH, M. E.; SCHTEINGART, D. F.; GROSS, C.; SEISMIC Study Investigators. Mifepristone, glucocorticoid receptor antagonist, produces clinical and metabolic benefits in patients with Cushing´s syndrome. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 6, p. 2039-2049, 2012.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E.; OLDFIELD, M. D. THOMAS, M. C. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, p. 254-258, 2003.

FULLER, P. M.; GOOLEY, J. J.; SAPER, C. B. Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback. **J. Biol. Rhythms**, v. 21, n. 6, p. 482-493, 2006.

GALBO, H.; HOLST, J. J.; CHRISTENSEN, N. J. Glucagon and plasma catecholamine responses to graded and prolonged exercise in man. **J. Appl. Physiol.**, v. 38, p. 70-76, 1975.

GANDA, O. P.; WEIR, G. C.; SOELDNER, J. S.; LEGG, M. A.; CHICK, W. L.; PATEL, Y. C.; EBEID, A. M.; GABBAY, K. H.; REICHLIN, S. "Somatostatinoma": A somatostatin-containing tumor of the endocrine pancreas. **N. Engl. J. Med.**, v. 296, p. 963-967, 1977.

GENUTH, S. M. Supra-renais. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. (Ed.) **Fisiologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 877-909.

GILAD, E.; WONG, H. R.; ZINGARELLI, B.; VIRAG, L.; O'CONNOR, M.; SALZMAN, A. L.; SZABÓ, C. Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFKappaB activation. **FASEB J.**, v. 12, n. 9, p. 685-693, 1998.

GOH, S. Y.; COOPER, M. E. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 4, p. 1143-1152, 2008.

GONZALEZ-HABA, M. G.; GARCIA-MAURIÑO, S.; CALVO, J. R.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M. High affinity binding of Melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4/). **FASEB J.**, v. 9, p. 1331-1335, 1995.

HEIMAN, M. L.; PORTER, J. R. Inhibitory effects of a pineal extract on adrenal cortex. Lack of competition with ACTH. **Horm. Res.**, v. 12, n. 2, p. 104-112, 1980.

LANSBERG, L.; YOUNG, J. B. Catecholamines and the adrenal medulla. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; DANIEL, W. (Ed.). **Williams textbook of endocrinology.** Philadelphia: WB Saunders Company, 1992.

LAU, E.; CARVALHO, D.; FREITAS, P. Gut microbiota: Association with NAFLD and metabolic disturbances. **Biomed. Res.**, v. 2015, 2015. In press.

LAUGERO, K. D. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback: implications to behavioral and metabolic disease. **Vitam. Horm.**, v. 69, p. 1-29, 2004.

LE ROY, T.; LLOPIS, M.; LEPAGE, P.; BRUNEAU, A.; RABOT, S.; BEVILACQUA, C.; MARTIN, P.; PHILIPPE, C.; WALKER, F.; BADO, A.; PERLEMUTER, G.; CASSARD-DOULCIER, A. M.; GÉRARD, P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. **Gut**, v. 62, n. 12, p. 1787-1794, 2013.

LEVENE, A. P.; GOLDIN, R. D. The epidemiology pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. **Histopathology**, v. 61, n. 2, p. 141-152, 2012.

LI, J.; SCHMIDT, A. M. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 26, p. 16498-16506, 1997.

LISSONI, P.; BARNI, S.; TANCINI, G.; BRIVIO, F.; TISI, E.; ZUBELEWICZ B.; BRACZKOWSKI B. Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implications in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor alpha. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 8, n. 4, p. 126-129, 1994.

LISSONI, P.; BARNI, S.; TANCINI, G.; ROVELLI, F.; ARDIZZOIA, A.; CONTI, A.; MAESTRONI, G. J. M. A study of the mechanisms involved in the immunostimulatory action of the pineal hormone in cancer patients. **Oncology**, v. 50, p. 399-402, 1993.

LISSONI, P.; VIGORE, L.; RESCALDANI, R.; ROVELLI, F.; BRIVIO, F.; GIANI, L.; BARNI, S.; TANCINI, G.; ARDIZZOIA, A.; VIGANO, M. G. Neuroimmunotherapy with low dose subcutaneous interleukin- 2 plus melatonin in AIDS patients with CD4 cell number below 200/mm3: a biological phase-II study**. J. Biol. Regul. Homeost.**, v. 9, p. 155-158, 1995.

MAESTRONI, G. J. M. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 18, n. 2, p. 84- 89, 1995.

MAESTRONI, G. J. M.; CONTI, A.; LISSONI. P. Colony stimulating activity and hematopoietic rescue from cancer chemotherapy compounds are induced by melatonin via endogenous interleukin 4. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4740-4743, 1994.

MAKINO, S.; HASHIMOTO, K.; GOLD, P. W. Multiple feedback mechanisms activating corticotrophin-releasing hormone system in the brain during stress**. Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 73, n. 1, p. 147-158, 2002.

MANDARINO, L.; BONADONNA, R.; MCGUINNESS, O.; WASSERMAN, D. Regulation of muscle glucose uptake in vivo. In: JEFFERSON, L. S.; CHERRINGTON, A. D. (Ed.). **Handbook of physiology.** Oxford: Oxford University Press, 2001. p. 803-848.

MAO, J.; DEMAYO, F. J.; LI, H.; ABU-ELHEIGA, L.; GU, S.; SHAIKENOV, T. E.; KORDARI, P.; CHIRALA, S. S.; HEIRD, W. C.; WAKIL, S. J. Liver-specific deletion of acetyl-CoA carboxylase 1 reduces hepatic triglyceride accumulation without affecting glucose homeostasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, n. 22, p. 8552-8557, 2006.

MARIISS, E. B.; AOKI, T. T.; POZEFSKY, T.; MOST, A. S.; CAHILL, G. F. Jr. Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in post-absorptive and prolonged-starved man. **J. Clin. Invest.**, v. 50, n. 8, p. 14-17, 1971.

MASTORAKOS, G.; CHROUSOS, G. P.; WEBER, J. S. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 77, n. 6, p. 1690-1694, 1993.

MCGARRY, J. D.; FOSTER, D. W. Hormonal control of ketogenesis. **Arch. Int. Med.**, v. 1, n. 37, p. 495-501, 1977.

MCGARRY, J. D.; WRIGHT, P.; FOSTER, D. W. Hormonal control of ketogenesis: Rapid activation of hepatic ketogenic capacity in fed rats by antiinsulin serum and glucagon. **J. Clin. Invest.**, v. 55, n. 1, p. 202-209, 1975.

MENCIN, A.; KLUWE, J.; SCHWABE, R. F. Toll-like receptors as targets in chronic liver diseases. **Gut**, v. 58, n. 5, p. 704-720, 2009.

MEVORACH, M.; GIACCA, A.; AHARON, Y.; HAWKINS, M.; SHAMOON, H.; ROSSETTI, L. Regulation of endogenous glucose production by glucose per se is impaired in type 2 diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 102, p. 744-753, 1998.

MONCADA S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell**, v. 78, p. 915-918, 1994.

NELSON, R. J.; DEMAS, G. E. Role of melatoninin mediating seasonal energetic and immunologic adaptations. **Brain Res.**, v. 44, p. 423-430, 1997.

NIKOLAOU, K.; SARRIS, M.; TALIANIDIS, I. Molecular pathways: the complex roles of inflammation pathways in the development and treatment of liver cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 11, p. 2810-2816, 2013.

NOGUEIRA, T. C.; LELLIS-SANTOS, C.; JESUS, D. S.; TANEDA, M.; RODRIGUES, S. C.; AMARAL, F. G.; LOPES, A. M.; CIPOLLA-NETO, J.; BORDIN, S.; ANHE, G. F. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. **Endocrinology**, v. 152, n. 4, p. 1253-1263, 2011.

ORTH, D. N.; KOVACS, W. J. The adrenal cortex. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONEN-BERG, H. M.; LARSEN, P. R. (Ed.). **Willians Textbook of endocrinology.** Philadelphia: WB Saunders Company, 1998, p. 517-664.

OXENKRUG, G. F.; MCINTYRE, I. M.; GERSHON, S. Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosterone circadian rhythm in rats. **J. Pineal Res.**, v. 1, n. 2, p. 181-185, 1984.

PERRS, S. H.; FLOWER, R. J. The role of lipocortin in corticosteroid actions. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 18-22, 1990.

PIERPAOLI, W. Pineal grafting and melatonin induce immunocompetence in nude (athymic) mice. **J. Neurosci.**, v. 68, p. 123-131, 1993.

POWELL, E. E.; COOKSLEY, W. G.; HANSON, R.; SEARLE, J.; HALLIDAY, J. W.; POWELL, L. W. The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. **Hepatology**, v. 11, n. 1, p. 74-80, 1990.

RADZIUK, J.; PYE, S. Diurnal rhythm in endogenous glucose production is a major contributor to fasting hyperglycaemia in type 2 diabetes. Suprachiasmatic deficit or limit cycle behaviour? **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1619-1628, 2006.

REINHARDT, E. L.; FERNANDES, P. A.; MARKUS, R. P.; FISCHER, F. M. Daily rhythm of salivary IL1 β, cortisol and melatonin in day and night workers. **Work**, v. 41, p. 5788-5790, 2012.

REITER, R. J. Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 16, p. 383-415, 1995a.

REITER, R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **FASEB J.**, v. 9, p. 526-533, 1995b.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. **Experientia**, v. 49, n. 8, p. 654-664, 1993.

REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Melatonin immune system relationships. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 2, p. 167-179, 2002.

RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; SKORUPA, A. L.; CIPOLLA-NETO, J.; CANTERAS, N. S. Projections of the basal retrochiasmatic area: a neural site involved in the photic control of pineal metabolism. **Brain Research**, v. 839, p. 35-40, 1999.

RODRIGUES, S. C.; PANTALEÃO, L. C.; NOGUEIRA, T. C.; GOMES, P. R. L.; ALBUQUERQUE, G.; NACHBAR, R.; TORRES-LEAL, F.; CAPERUTO, L.; LELLIS-SANTOS, C.; ANHÊ, G; BORDIN, S. Selective regulation of hepatic lipid

metabolism by the AMP-activated protein kinase pathway in late-pregnant rats. **J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.,** v. 307, n. 9, p. 1146-1156, 2014.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 118, n. 9, p. 2992-3002, 2008.

SCHLEIMER, R. P. Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 141, p. 59-69, 1990.

SCHMIDT, A. M.; STERN, D. M. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 11, n. 9, p. 368-375, 2000.

SCHWABE, R. F.; BRENNER, D. A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 290, n. 4, p. 583-589, 2006.

SCOTT, E. M.; GRANT, P. J. Neel revisited: the adipocyte, seasonality and type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 49, n. 7, p. 1462-1466, 2006.

SPENCER, M. D.; HAMP, T. J.; REID, R. W.; FISCHER, L. M.; ZEISEL, S. H.; FODOR, A. A. Association between composition of the human gastrointestinal microbiome and development of fatty liver with choline deficiency. **Gastroenterology**, v. 140, n. 3, p. 976-986, 2011.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New Horiz.**, v. 3, n. 1, p. 2-32, 1995.

TARANTINO, G.; SALDALAMACCHIA, G.; CONCA, P.; ARENA, A. Nonalcoholic fatty liver disease: further expression of the metabolic syndrome. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 22, n. 3, p. 293-303, 2007.

THROCKMORTON, D. C.; BROGDEN, A. P.; MIN, B.; RASMUSSEN, H.; KASHGARIAN, M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. **Kidney Int.**, v. 48, n. 1, p. 111-117, 1995.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. **Hepatology**, v. 52, n. 5, p. 1836-1846, 2010.

UMEKI, S.; SOEJIMA, R. Hydrocortisone inhibits the respiratory burst oxidase from human neutrophils in whole-cell and cell-free systems. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1052, n. 1, p. 211-215, 1990.

UNGER, R. H.; DOBBS, R. E.; ORCI, L. Insulin, glucagon and somatostatin secretion in the regulation of metabolism. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 40, p. 307-343, 1978.

VLASSARA, H. Advanced glycosylation in nephropathy of diabetes and aging. **Adv. Nephrol. Necker Hosp.**, v. 25, p. 303-315, 1996. MARTINS, E. JR.; FERREIRA, A. C.; SKORUPA, A. L. AFECHE, S. C. CIPOLLA-NETO, J. COSTA ROSA, L. F. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 75, n. 6, p. 1116-1121, 2004.

VRANIC, M.; KAWAMORI, R.; PEK, S.; KOVACEVIC, N.; WRENSHALL, G. A. The essentiality of insulin and the role of glucagon in regulating glucose utilizatlon and production during strenuous exercise in dogs. **J. Clin. Invest.**, v. 57, p. 245-255, 1976.

VRANIC, M.; KAWAMORI, R.; WRENSHALL, G. A. Mechanism of exercise induced hypoglycemia in depancreatized insulin-treated dogs. **Diabetes**, v. 23, p. 353, 1974. Suppl.

VRANIC, M.; WRENSHALL, G. A. Exercise, insulin, and glucose turnover in dogs**.** **Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 165-167, 1969.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ.**, v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003.

WEITZMAN, E. D.; FUKUSHIMA, D.; NOGEIRE, C.; ROFFWARG, H.; GALLAGHER, T. F.; HELLMAN, L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 33, p. 14-22, 1971.

MAESTRONI, G. J. M.; CONTI, A.; PIERPAOLI, W. Role of the pineal gland in immunity: II. Melatonin enhances the antibody response via an opiatergic mechanism. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 68, p. 384-390, 1987.