

**Eduardo de Almeida Leite**

**Efeitos da suplementação de melatonina e do  
treinamento físico aeróbio na sensibilidade à insulina  
em ratos espontaneamente diabéticos tipo II (Goto-  
Kakizaki)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paul, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo  
2020**

**Eduardo de Almeida Leite**

**Efeitos da suplementação de melatonina e do  
treinamento físico aeróbio na sensibilidade à insulina  
em ratos espontaneamente diabéticos tipo II (Goto-  
Kakizaki)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade de São Paul, para obtenção  
do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr José Cipolla Neto

Versão original

**São Paulo  
2020**

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Almeida Leite, Eduardo  
Efeitos da suplementação de melatonina e do  
treinamento físico aeróbico na sensibilidade à insulina  
em ratos espontaneamente diabéticos tipo II (Goto  
Kakizaki) / Eduardo Almeida Leite; orientador  
José Cipolla Neto. -- São Paulo, 2020.  
77 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melatonina. 2. Exercício Físico. 3. Diabetes  
mellitus tipo 2. I. Cipolla Neto, José ,  
orientador. II. Título.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

---

**Candidato(a): Eduardo de Almeida Leite**

**Título da Dissertação/Tese: Efeitos da suplementação de melatonina e do treinamento físico aeróbio na sensibilidade à insulina em ratos espontaneamente diabéticos tipo II (Goto- Kakizaki)**

**Orientador: Prof. Dr José Cipolla Neto**

**A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão publicada e realizada a ...../...../ ..... , considerou o(a) candidato(a):**

**( ) Aprovado(a)**

**( ) Reprovado(a)**

**Examinador(a): Assinatura: .....**

**Nome: .....**

**Instituição: .....**

**Examinador(a): Assinatura: .....**

**Nome: .....**

**Instituição: .....**

**Presidente: Assinatura: .....**

**Nome: .....**

**Instituição: .....**



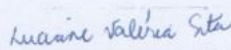
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.143.2017

### DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **86/2016/CEUA**, válido até 12/09/2020, e por solicitação do Prof. Dr. **José Cipolla Neto**, do Departamento de Fisiologia e Biofísica, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão do aluno **Eduardo de Almeida Leite** ao Projeto de Pesquisa "**Melatonina e a Regulação do Metabolismo Energético**", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 01 de agosto de 2017.

  
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora da CEUA-ICB/USP

**Disse a raposa: “O essencial é  
invisível aos olhos”.**

**O pequeno príncipe.**

## **AGRADECIMENTOS**

**A minha mãe Carmen, que mesmo com a pouca oportunidade que a vida lhe ofereceu de se escolarizar, me ensinou coisas das quais eu só encontrei na mais fina filosofia.**

**Eu te amo!**

**Ah... outra coisa, obrigado pelas mitocôndrias rs**

**Ao meu pai George (in memória) foram apenas 10 anos de convivência, mas seus exemplos de trabalho e honestidade forjaram meu caráter**

**Aos meus irmãos Edson “o Cham”, Edna “a Buguinha” minha segunda mãe, Edilson “o Caca” e minha cunhada Maria Aparecida “a Didi” minha eterna gratidão, por tudo que fizeram e ainda fazem por mim**

**As minhas queridas e lindas sobrinhas Thais, Thaiane e Amanda, amo vocês!**

**Ao meu grande amigo Alexandre “o Xandy” pela amizade e parceria de sempre**

**Ao Prof, Dr José Cipolla Neto (grande figura humana) pela oportunidade e ensinamentos, serei eternamente grato. A ciência precisa de mais pessoas como o Sr.**

**A todos professores que cruzaram minha trajetória, em especial Prof, Fumagalli e Ronaldo Melo, vocês são grandes construtores de pontes, meu eterno respeito, carinho e amizade**

**A todos meus amigos de laboratório e vida acadêmica, não vou citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém, mas em especial ao Sinésio por toda ajuda e parceria**

**A Julieta “a Ju” por toda ajuda e carinho, adoro você.**

**A Patricia “a Paty” por toda ajuda nos experimentos, todos os conselhos científicos (nem sempre ouvidos rs), pelo carinho empregado a mim, esse trabalho em parte é seu. Adoro você**

**A CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.**

**O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica)".**

**“A dúvida é o princípio da sabedoria”**

**Aristóteles**

**RESUMO**

**Leite EA. Efeitos da suplementação de melatonina e do treinamento físico aeróbio na sensibilidade à insulina em ratos espontaneamente diabéticos tipo II (Goto-**



**Kakizaki**). 2020. 77 f. Dissertação de mestrado (Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2020.

O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico primário dos carboidratos que envolve de forma secundária e não menos importante lipídeos e proteínas, caracterizado por hiperglicemia plasmática de jejum e pós-prandial. Sabe-se que o exercício físico é um potente agente não farmacológico, promovendo melhora na homeostase glicêmica, aumentando a sensibilidade à insulina. Além disso, o aumento da glicemia está associado a redução dos níveis séricos de melatonina. A melatonina é o principal hormônio sintetizado e secretado pela glândula pineal durante e, está associada à regulação de diversos processos fisiológicos, dentre eles, o metabolismo energético. Neste sentido, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da suplementação com 3 mg de melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre a sensibilidade periférica a insulina nos animais espontaneamente diabéticos do tipo II (Goto Kakizaki). Para isso, os animais passaram por um protocolo de treinamento físico aeróbio (incremento gradativo de 50/80% do VO<sub>2</sub>máx) e receberam melatonina diluída na água durante doze semanas, sendo que o tratamento iniciou-se a partir da décima semana de vida, momento em que o quadro de diabetes já está instalado nesse modelo. No início e final do protocolo experimental foi mensurado o peso corporal e realizados testes de tolerância à glicose (GTT) e à insulina (ITT). Os animais foram mantidos em biotério com ciclo de iluminação claro e escuro 12h/12h, receberam água e alimento *ad libitum* e, ao final do protocolo, foram eutanasiados 24 horas após a última sessão de exercício. O tecido muscular (sóleo, extensor digital longo), foi coletado para análise da expressão gênica (qPCR) e protéica (Western Blot), das vias de captação de glicose e sinalização insulínica: GLUT4, IR, IRS1 e 2, PI3K, AKT, GSK-3β. Pretendeu-se ainda analisar a morfologia do tecido muscular. No fígado foi avaliado a via de sinalização insulínica através dos genes: GLUT2, IR, IRS1 e 2, PI3K e AKT, e a neoglicogênese através da PEPCK e a glicogênese através da GSK3B. O soro foi coletado para verificar as concentrações de insulina e melatonina. Os resultados indicam que o tratamento com melatonina associado com treinamento físico produz efeito positivo na sensibilidade a insulina e tolerância a glicose e, que o exercício físico e tratamento com melatonina possui aparente papel protetor no tecido pancreático.

Palavras-chave: Melatonina, Exercício físico, Diabetes Mellitus, Homeostase Glicêmica.

#### ABSTRACT

Leite EA. **Effects of melatonin supplementation and aerobic exercise training on insulin sensitivity in spontaneously diabetic type II rats (Goto-Kakizaki).** 2020. 77 f.

Dissertação de mestrado (Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2020.

Diabetes mellitus is a primary metabolic carbohydrate disorder that involves secondary and no less important forms of lipids and proteins, those used by fasting and postprandial plasma hyperglycemia. You know if exercise is a potent non-pharmacological agent in this pathological condition, as it improves glycemic homeostasis and increases insulin sensitivity. In addition, increased blood glucose is associated with a reduction in serum melatonin levels. Melatonin is the main hormone synthesized and secreted by the pineal gland in scotoperiods and is associated with changes in several physiological processes, including energy metabolism. In this sense, the present study aims to evaluate the synergistic effect of supplementation with 3 mg melatonin and aerobic physical training on peripheral insulin sensitivity of spontaneously diabetic type II animals (Goto Kakizaki). For this, the animals undergo an aerobic physical training protocol (50/80% increase in the VO<sub>2</sub>máx) and receive diluted melatonin in the water for twelve weeks, and the treatment started from the week of life, when that diabetes is already installed in this model. At the beginning and end of the experimental protocol, body weight and glucose tolerance (GTT) and insulin (ITT) tests were tested. The animals were kept in a vivarium with 12h / 12h light and dark lighting cycle, water and food. ad libitum and, at the end of the protocol, were euthanized 24 hours after the last exercise session. Muscle tissue (soleus, long digital extensor) was collected for analysis of gene (qPCR) and protein (Western Blot) expression of glucose uptake pathways and insulin signaling: GLUT4, IR, IRS1 and 2, PI3K, AKT, GSK-3 $\beta$ . It is also intended to analyze a morphology of muscle tissue. No liver was evaluated by insulin signaling through the genes: GLUT2, IR, IRS1 and 2, PI3K and AKT, and a PEPCCK neoglycogenesis and a GSK3B glycogenesis. Serum was collected to check how to monitor insulin and melatonin. The results show that melatonin treatment associated with physical training has a positive effect on insulin sensitivity and glucose tolerance, and that exercise and melatonin treatment play a protective role in non-pancreatic tissue.

Keywords: Melatonin, Exercise, Diabetes Mellitus, Glycemic Homeostas

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**5-HT: Serotonina.**

**5-HTP: 5-Hidroxitriptfano.**

**AANAT: Arilalquilamina N-acetiltransferase.**

**ADP: Adaptação.**

**AGL: Ácido graxos livres.**

**AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide.**

**AKT: Proteína cinase B.**

**AMPK: Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina.**

**ASMT: Acetil serotonina-oxi-metiltransferase.**

**AUC: Área sob a curva.**

**BcL-xl: B-cell lymphoma-extra large.**

**Cat: Catalase.**

**DM2: Diabetes mellitus tipo 2.**

**DNA: Ácido desoxirribonucleico.**

**E: Exercício.**

**EDL: Extensor digital longo.**

**EM: Exercício Melatonina.**

**EROS: Espécies reativas de oxigênio.**

**G6F: Glicose 6 fosfato.**

**GCS: Gânglio cervical superior.**

**GLUT: Transportador de glicose**

**GK: Goto Kakizaki.**

**GSK3 $\beta$ : Glicogênio sintase cinase 3 beta.**

**GHS: Glutathiona.**

**GTT: Teste de tolerância à glicose.**

**HDL: Lipoproteína de alta densidade.**

**H&E: Hematoxilina-Eosina.**

**HIONT: Hidroxiindol-oxi-metiltransferase.**

**HO-1: Heme oxygenase 1.**

**IDF: Internation Diabetes Federation.**

**IL6: Interleucina**

**IKK: Inibidor do fator nuclear kappa.**

**INS-1: Linhagem de células  $\beta$**

**IML: Coluna intermédio lateral.**

**IR: Receptor de insulina.**

**IRS: Substrato do receptor de insulina.**  
**ITT: Teste de tolerância à insulina.**  
**JNK: Janus cinase.**  
**Kg: Quilogramas.**  
**LDL: Lipoproteína de baixa densidade.**  
**LPS: Lipopolissacarídeos.**  
**MIN: Minutos.**  
**MODY: Diabetes of the Young.**  
**MT1: Receptor 1 para melatonina de membrana.**  
**MT2: Receptor 2 para melatonina de membrana.**  
**m-TOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos.**  
**NAS: N-acetilserotonina.**  
**NF-KB: Fator de transcrição KB.**  
**NHP: Núcleo paraventricular hipotalâmico.**  
**NOR: Noradrenalina.**  
**NSQ: Núcleo supraquiasmático.**  
**PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxiquinase**  
**PH: Domínio da proteína tirosina-cinase.**  
**PI3K: Fosfatidilinositol 3- cinase**  
**PIP2: Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato.**  
**PKB: Proteína cinase B.**  
**PTPs: Proteína tirosina fosfatase.**  
**RTKs: Receptor tirosina cinase.**  
**SH2: Domínio de atividade regulatória.**  
**TLR-4: Toll-like receptor 4.**  
**UI: Unidades internacionais.**  
**ZT: Zeitgeber Time “doador de tempo”.**

## **Sumário**

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
---------------------------	-----------

<b>1.1 BREVE HISTÓRICO</b> .....	15
<b>1.1.2 MELATONINA E GLÂNDULA PINEAL</b> .....	15
<b>1.2 DIABETES MELLITUS</b> .....	20
<b>1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 2 E RESINTÊNCIA À INSULINA</b> ....	22
<b>1.2.2 OUTRAS FORMAS DE DIABETES MELLITUS</b> .....	24
<b>1.2.3 DIABETES MELLITUS E MELATONINA</b> .....	25
<b>1.2.4 DIABETES MELLITUS E EXERCÍCIO FÍSICO</b> .....	26
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	29
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	30
<b>4.1 ANIMAIS</b> .....	30
<b>4.2 DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....	30
<b>4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA</b> .....	31
<b>4.4 PROTOCOLO DO TREINAMENTO FÍSICO</b> .....	33
<b>4.5 TESTE DO ESFORÇO MÁXIMO</b> .....	33
<b>4.6 TESTE DO LACTATO</b> .....	34
<b>4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA</b> .....	36
<b>4.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)</b> .....	36
<b>4.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)</b> .....	37
<b>5. DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS E METÁBOLICAS</b> .....	37
<b>5.1 VIA DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA ESTIMULADA</b> .....	38
<b>5.2 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR</b> .....	38
<b>5.3 ANÁLISE PROTEICA - IMUNOBLOTTING</b> .....	38
<b>5.4 EXTRAÇÃO DE RNA</b> .....	39
<b>5.5 OBTENÇÃO DE cDNA</b> .....	40
<b>5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO DE CADEIA EM POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL</b> .....	40
<b>6. PREPARO DO TECIDO PANCREÁTICO</b> .....	40
<b>6.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (H&amp;E)</b> .....	41
<b>6.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA INSULINA</b> .....	41
<b>7. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	43
<b>8. RESULTADOS</b> .....	45

<b>9 DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>10 REFERÊNCIAS</b> .....	65

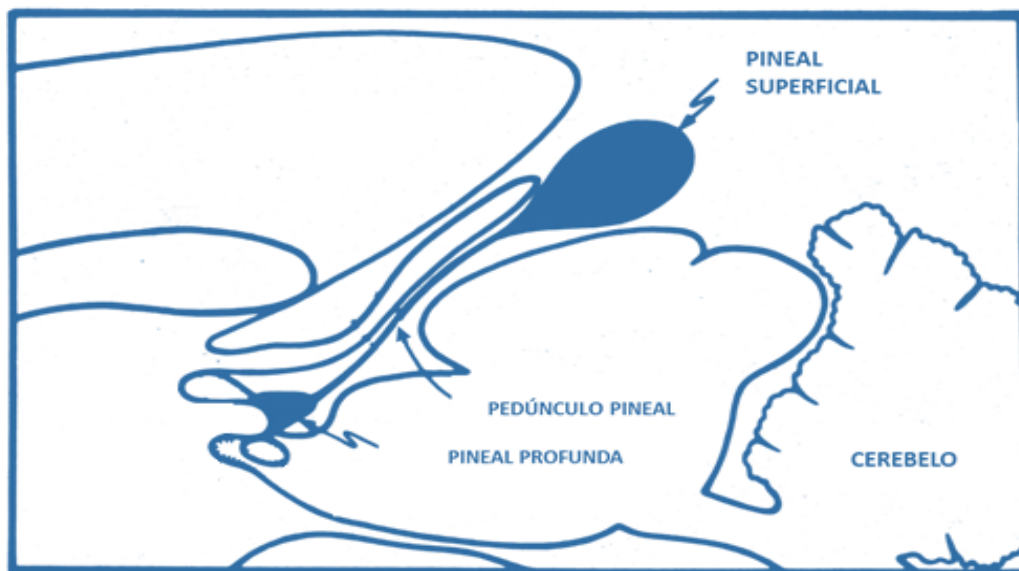
# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 BREVE HISTÓRICO**

Desde sua primeira descrição por Galeano de Pérgamo entre os séculos III e IV a.C, e, de acordo com a concepção científica e filosófica decorrente do momento histórico investigado, a glândula pineal recebeu diversas atribuições funcionais. Sendo até mesmo considerada a “sede da alma” por René Descartes. Até que, em 1958 a equipe de pesquisadores liderada por Aaron Lerner, conseguiu finalmente isolar o fator ativo da glândula pineal, uma indolamina, que devido à sua capacidade de agregar grânulos de melanina em melanócitos foi denominada melatonina (ARENDETT, 1995; CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018). Devido a sua história filogenética, ela adquiriu vários modos únicos de regular os efeitos fisiológicos em mamíferos. Embora a melatonina exiba efeitos noturnos imediatos, ela também tem efeitos tardios expressados no dia seguinte, que ocorrem na ausência desse hormônio (CIPOLLA-NETO e AMARAL, 2018). A literatura contemporânea atribui a ela participação na organização temporal de ritmos biológicos, atuando como mediador entre o ciclo claro/escuro ambiental e, processos circadianos e sazonais, incluindo a regulação endócrina do metabolismo e reprodução, regulação dos ciclos de atividade-reposo e sono/vigília, regulação do sistema imunológico, da pressão arterial, entre outros. Além disso, apresenta efeitos transgeracionais importantes para a programação fetal, levando a um metabolismo energético equilibrado na vida adulta. (CIPOLLA NETO; AFECHE, 1999; CIPOLLA-NETO, AMARAL, 2018).

### **1.1.2 MELATONINA E GLÂNDULA PINEAL**

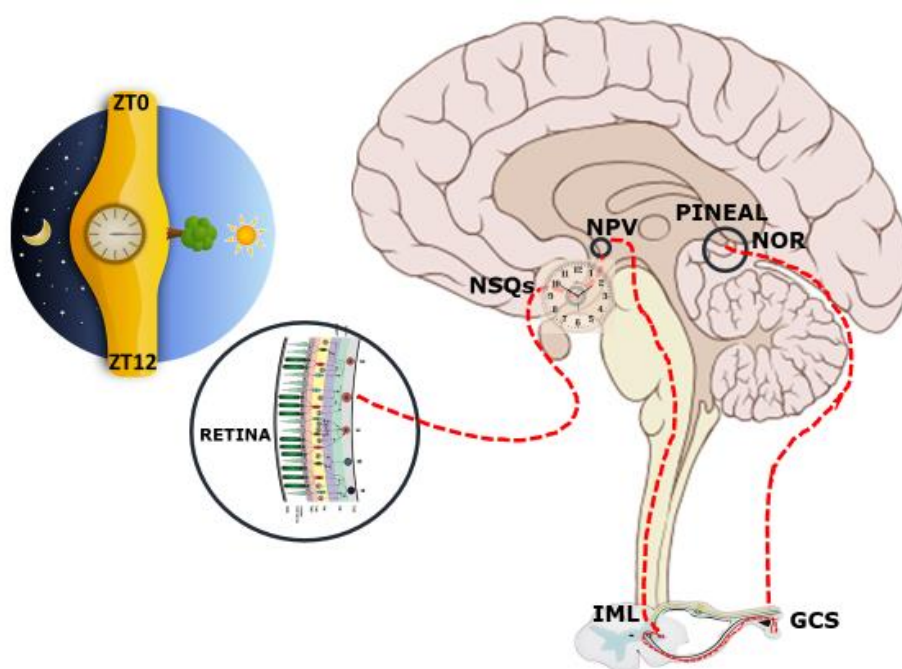
Constituída por uma estrutura epitalâmica pequena e única, a glândula pineal está localizada dorsalmente à região caudal do diencéfalo. Derivando-se de células neuroectodérmicas e, semelhantemente às células da retina, desenvolve-se a partir de uma evaginação do terceiro ventrículo (KAPPERS et al., 1960). A pineal de roedores apresenta um complexo formado por três porções distintas, pineal profunda, pedúnculo pineal e pineal superficial, como demonstrado na figura 1 (MOLLER, 1992).



**Figura 1** - Localização anatômica da glândula pineal de rato apresentando suas três porções distintas: pineal superficial, pedúnculo pineal e pineal profunda. Adaptado de Swanson, L. W. 1998.

Predominantemente fotossensível em algumas espécies de vertebrados, como peixes, anfíbios, répteis e aves, a glândula pineal perde essa característica e passa a exercer um caráter exclusivamente neuroendócrino em mamíferos (COLLIN, 1971; VOLLRATH, 1981; KORF, 2000). A produção de melatonina é temporizada pelo sistema circadiano e sincronizada ao ciclo claro/escuro ambiental. Assim, células ganglionares intrinsecamente foto sensíveis recebem informações da iluminação ambiental e transmitem essas informações fotoperiódicas, sincronizando assim, o relógio mestre localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico (NSQ). Este, por sua vez, temporiza o sistema neural responsável pela síntese de melatonina. Esse sistema é representado pelo núcleo paraventricular hipotalâmico (NPH) e, a partir de suas projeções neuronais, de forma direta e indireta, termina sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos da coluna intermédia lateral da medula espinhal (IML). Esses neurônios, então, projetam-se sobre o gânglio cervical superior (GCS) dando origem a inervação simpática que caminha pelos nervos conários, ramos dos carotídeos internos, que atinge a glândula pineal. Esta inervação simpática libera noradrenalina nos interstícios da glândula, estimulando a síntese de melatonina, através de sua interação com os adrenoreceptores  $\beta$  e  $\alpha$  (KAPPERS, 1960). Esse esquema está demonstrados na Figura 2.



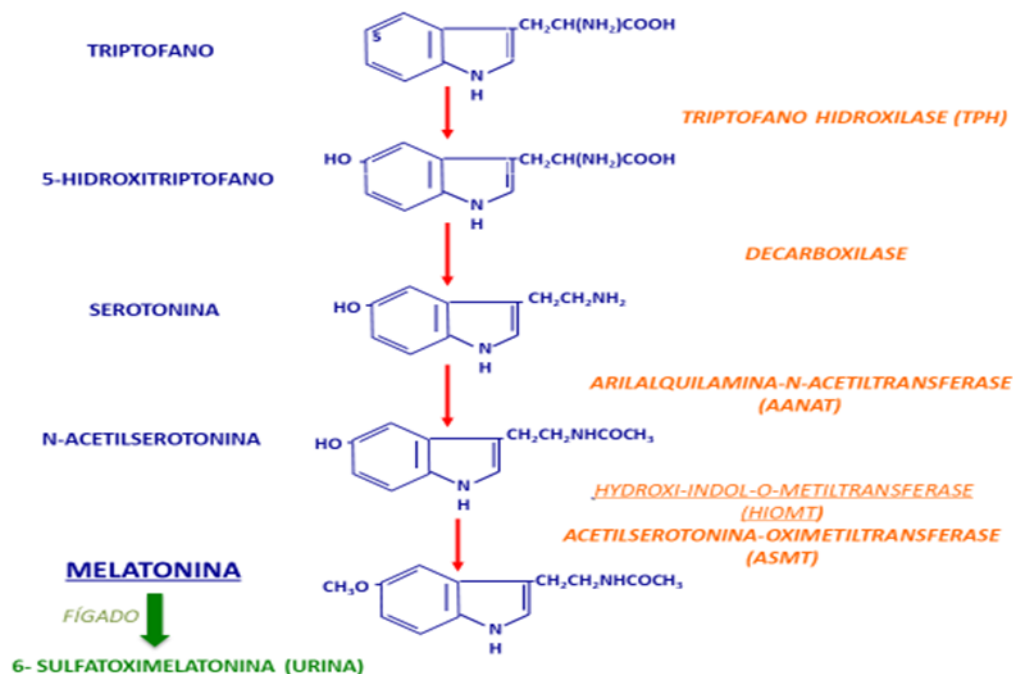


**Figura 2** - A síntese de melatonina é controlada por um sistema neural com origem no núcleo paraventricular hipotalâmico que, por sua vez, é temporizado pelo sistema de temporização circadiano, representado pelas projeções dos NSQs. Estes são sincronizados pela variação da luminosidade diária do ciclo claro-escuro ambiental captada pela retina. Esse sistema garante que a síntese da melatonina se dê apenas na fase escura. NSQs: núcleos supraquiasmáticos; NPV: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédia lateral da medula espinhal; GCS: gânglio cervical superior; P: pineal; NOR: noradrenalina (Adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

A liberação de norepinefrina dá-se exclusivamente na fase escura da noite; o aminoácido triptofano é o substrato precursor da síntese de melatonina que envolve um conjunto de reações enzimáticas, iniciando a conversão de triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase. O 5-HTP passa por uma descarboxilação que culmina na formação de serotonina (5-HT). Posteriormente, a serotonina sofre a ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) sendo convertida em N-acetilserotonina (NAS), o grupamento hidroxila é trocado por um metil pela ação da enzima acetilserotonina-oxi-metiltransferase (ASMT) antes denominada hidroxindol-oxi-metiltransferase (HIOMT), acarretando a formação da melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina).

Após sua síntese, a melatonina é imediatamente liberada na corrente sanguínea, não sendo armazenada na glândula. A melatonina plasmática circula ligada à albumina, com meia vida de aproximadamente 20 minutos em ratos e 44 minutos em humanos, (PANG et. al., 1993). Sendo que, em uma única passagem pelo fígado, mais de 90% da

melatonina é metabolizada e, convertida em 6- hidroximelatonina, que após conjugação com sulfatos ou com glucoronídeos é eliminada na urina sob a forma de 6-sulfatoximelatonina (CARDINALI, VACAS, 1987; REITER, 1991; AFECHE E CIPOLLA-NETO, 2008) Figura 3.



**Figura 3** - Representação das enzimas envolvidos na síntese da melatonina pineal (adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

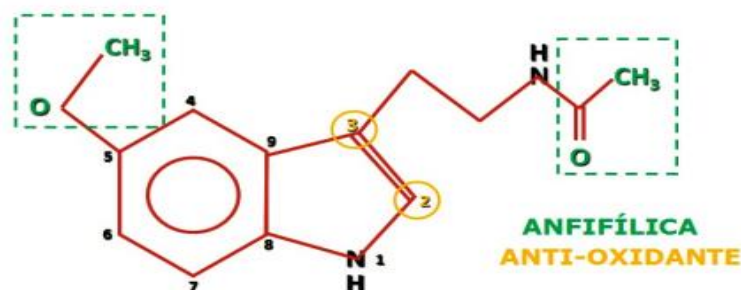
Muitos outros tecidos e órgãos, como por exemplo; retina, sistema gastrointestinal, medula óssea e pele, também possuem maquinaria para síntese dessa indolamina; Entretanto, a produção de melatonina nestas células possui ação autócrina e parácrina e, em condições de normalidade fisiológica, não é lançada na circulação sistêmica (CIPOLLA-NETO, AMARAL, 2018).

A molécula melatonina apresenta características anfifílicas, pois encontra-se em sua estrutura química um grupamento metóxi no carbono 5 e um grupamento acil ligado ao nitrogênio do grupo amina (CIPOLLA-NETO e AFECHE, 2008). E os seus carbonos 2 e 3 do anel pirrólico possuem alta capacidade de doar elétrons, permitindo que essa molécula apresente uma alta capacidade anti-oxidante, sendo portanto, um dos agentes anti-oxidantes naturais mais importantes (TAN et al., 2002) Figura 4.

Devido a essa propriedade, a melatonina pode ser encontrada em todos os compartimentos do organismo, interagindo com moléculas intracelulares e, desencadeando ações não mediadas por receptores. Como também interações mediadas por receptores de membrana de alta afinidade, tais como: MT1 e MT2, que possuem sete alças transmembrânicas e atuam em associação à proteína  $G_i$  expresso (REPPERT, 1996; SUGDEN, 2000; BRAYDON et al, 2001; CIPOLLA-NETO, AMARAL, 2018). A expressão dos receptores de melatonina está difundida por todo organismo, sendo localizado nos tecidos periféricos e no sistema nervoso central (GILLETTE, MITCHELL, 2002; LAITINEN, STAELS, 2003; SMIRNOV, 2001).

Neste sentido a melatonina participa de uma ampla variedade de processos fisiológicos, incluindo ritmos circadianos e sazonais, regulação neuroendócrinas e funções imune (LEIBOWITZ et al., 2008). Além disso, mobiliza mecanismos reparadores do DNA (Burkhardt et al., 2001), regulando diretamente a ação de diversas enzimas, possui também ação intra-mitochondrial, regulando o metabolismo oxidativo, e o transporte de elétrons (REITER et a.l., 2004). A melatonina também é capaz de regular o processo de apoptose celular (MAYO et al., 1998). Tem efeitos anti-hipertensivos (LEIBOWITZ et al., 2008), hipolipidômicos e anti-obesogênicos (WOLDEN-HANSON et al., 2000; RIOS-LUGO et al., 2010; Cipolla-Neto et al., 2014). Além do mais, uma série de estudos vem demonstrando que a suplementação com melatonina melhora a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose em animais diabéticos (VAN-GEIJLSWIJK; KORZILIUS; SMITS, 2010; ANOTHASINTAWEE et al., 2017; MCMULLAN et al., 2013; RUBIO-SASTR et al., 2014; Cipolla-Neto et al., 2014; COSTES et al., 2015; HARDELAND, 2017).

**N- ACETIL- 5-METOXITRIPTAMINA**



**Figura 4** - Representação das características químicas da molécula de melatonina (adaptado de CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008)

## 1.2 DIABETES MELLITUS

Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes, cerca de 425 milhões de pessoas vivem com diabetes em 2018. Se as tendências atuais persistirem, espera-se que em 2045 este número seja superior a 629 milhões de indivíduos. (International Diabetes Federation (IDF), 2018). No Brasil dados do Ministério da saúde apontavam que no ano de 2006 a doença atingia 5,5% da população, em 2016 o número de pessoas com diabetes mellitus aumentou 61,8% chegando a 16 milhões de brasileiros e, os custos aos cofres públicos superaram a marca de US\$57,7 bilhões.

Embora o cenário atual seja alarmante, a história da humanidade é permeada de registros sobre a doença, e a construção do conhecimento sobre a patologia é fruto do incessante trabalho de pesquisadores.

Descoberto em 1873 pelo alemão Georg Erbes, o Papiro Erbes é um dos tratados médicos mais antigos e importantes que se conhece. Escrito no antigo Egito no reinado Amenophis I (1536 a.C), acredita-se que este manuscrito tenha sido confeccionado utilizando como referência textos ainda mais antigos, que datam de cerca 3400 a.C. Este é o primeiro documento referindo-se a uma doença caracterizada pela produção excessiva de urina (KING, RUBIN, 2003).

No século II d.C na Grécia, Araeteus, discípulo de Hipócrates, foi o primeiro a utilizar o termo “diabetes” (que significa passar através de um sifão) fazendo uma analogia a poliúria característica da doença. William Cullen em 1769 adicionou os adjetivos do latim “mellitus”, que significa mel, e “insipidus”, que significa sem gosto, distinguindo assim duas enfermidades com características em comum, poliúria e polidipsia, porém de causas distintas. (KING, RUBIN, 2003; EKNOYAN, 2006)

Em 1776, Mathew Dobson na Inglaterra, demonstrou experimentalmente a perda de glicose na urina de pacientes com diabetes mellitus, aquecendo a urina até sua evaporação e formação de resíduos de açúcar. Embora houvesse avanços no conhecimento sobre a patologia, pouco se podia fazer aos indivíduos acometidos com esta moléstia. Até que, em 1869 um estudante de medicina alemão, Paul Langerhans, anunciou em sua dissertação, que o pâncreas se dividia em dois sistemas celulares. Os ácinos, que secretavam o suco pancreático, e outro grupo de células cuja função era desconhecida (NETTO, 2000; KING, RUBIN, 2003).

Em 1889, Oskar Minkowski e Joseph von Mering, na Universidade de Strasbourg, em experimentos com cães observaram que a retirada do pâncreas causava perda de glicose na urina destes animais, porém ainda faltava o elo que ligasse o pâncreas ao

diabetes. Foi quando em 1921, mais de 3000 anos depois dos primeiros relatos sobre a doença que, os pesquisadores Frederick Banting e Charles Best, no laboratório do professor de fisiologia John J. R. MacLeod, conseguiram finalmente encontrar uma peça fundamental neste enigma, isolaram a substância pancreática ativa, secretada endocrinamente, que regulava a homeostase glicêmica e a chamaram insulina. A descoberta rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia em 1923 aos pesquisadores e proporcionou uma esperança no tratamento da doença (KING, RUBIN, 2003; ITR, 2006)

A revolução tecnológica do século XX permitiu grandes avanços no entendimento da patologia, nos mecanismos moleculares e na capacidade de diagnóstico. Entretanto, mesmo assim, a humanidade vive uma grande epidemia da doença.

Atualmente, o diabetes mellitus é compreendido por um grupo de diferentes desordens caracterizado por elevadas concentrações de glicose plasmática, decorrentes de uma deficiência relativa ou absoluta na produção de insulina ou em sua sinalização, ou ainda em uma sinergia dessas condições. O distúrbio metabólico primário dos carboidratos envolve de forma secundária e não menos importante lipídeos e proteínas, estando associado cronicamente a disfunções danosas em vários sistemas como: cardíaco, vascular, renal e nervoso (ZIMMET et al., 2001; MELO et al., 2012).

Desse modo, a classificação da doença se distribui em quatro grandes grupos (quadro 1) baseando-se em sua etiologia e, em fenômenos de sua causalidade (ambientais, biológicos e genéticos), ainda não totalmente elucidados pela ciência (SKYLER JS, et al 2017).

<b>Classificação etiológica de diabetes mellitus</b>	
<b>1</b>	<b>Tipo 1:</b> deficiência de insulina por destruição autoimune das células betas pancreáticas.
<b>2</b>	<b>Tipo 2:</b> Resistência à insulina combinada com perda progressiva de secreção insulínica.
<b>3</b>	<b>Gestacional:</b> hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de diabetes mellitus prévio
<b>4</b>	<b>Outros tipos de diabetes mellitus:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Monogênicos (MODY);</li> <li>- Diabetes neonatal;</li> <li>- Secundário a endocrinopatias;</li> <li>- Secundário a doenças do pâncreas exócrino;</li> <li>- Secundário a infecções;</li> <li>- Secundário a medicamentos.</li> </ul>

**Quadro 1-**Fonte: adaptado de American Diabetes Association - ADA; 2017.

### 1.2.1 DIABETES MELLITUS TIPO 2 E RESISTÊNCIA À INSULINA

O diabetes mellitus tipo 2 é uma doença complexa e multifatorial, responsável pela ocorrência de 90 a 95% dos casos. Entre os fatores de risco destaca-se o forte componente genético e histórico familiar, aliados a fatores ambientais como estilo de vida, componentes da síndrome metabólica e microbiota intestinal (NEWTON CA, RASKIN P. 2004).

A incidência é maior em indivíduos após a quarta década de vida, embora atualmente ocorra um grande aumento de casos em crianças e adolescentes, devido principalmente a fatores crescentes na sociedade contemporânea, como: inatividade física e obesidade (PRASAD, GROOP, 2015).

Em gênese o DM2 é gerado por uma falha na transdução do sinal entre a insulina e seu receptor, e a compreensão das bases moleculares da fisiopatologia necessita de entendimento de sua sinalização em células normais.

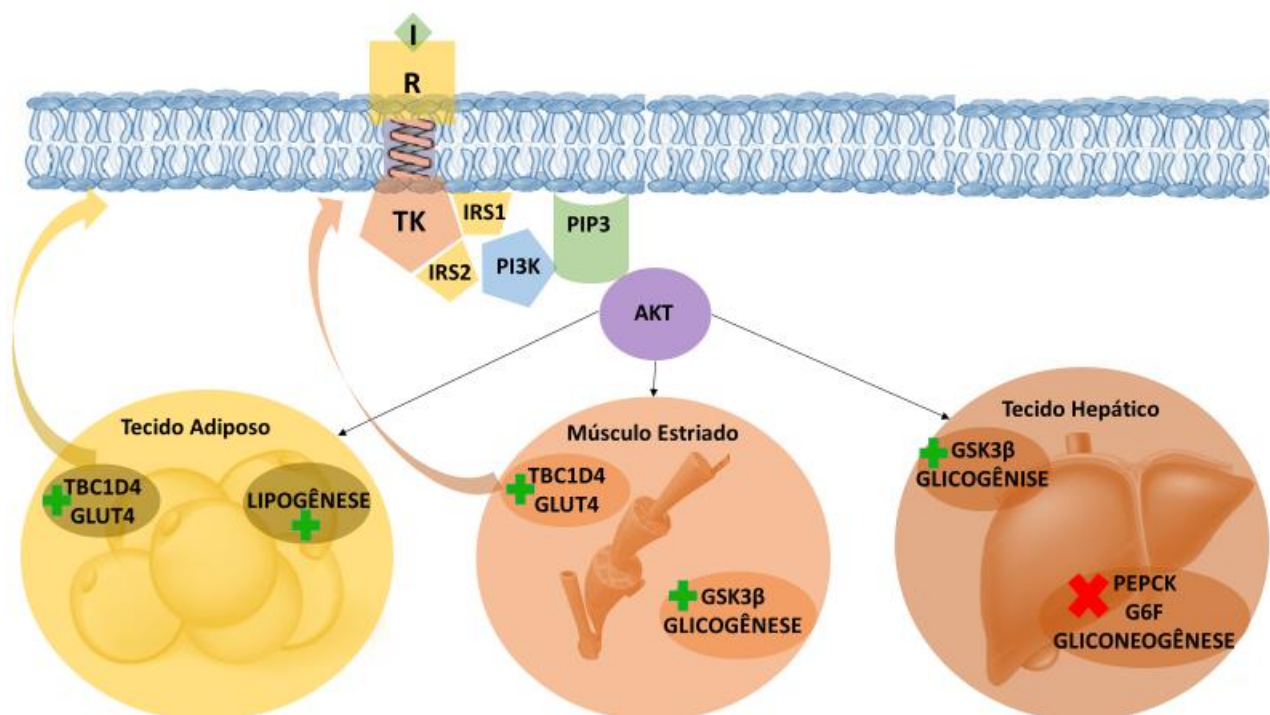
A insulina é um hormônio polipeptídico de 5,8 KDa que desencadeia suas respostas através de um receptor pertencente à família de tirosina quinases (RTKs), uma glicoproteína heterotetramérica composta por duas subunidades  $\alpha$  extracelulares de 135kDa (kahn, 1985) e duas subunidades  $\beta$  transmembrânicas de 95kDa com atividade tirosina cinase (KASUGA; KARLSSON; KAHN, 1982). A ligação do hormônio ao receptor produz uma mudança conformacional na estrutura proteica permitindo sua autofosforilação e, conseqüentemente a fosforilação de outros substratos em resíduos de tirosina (ULLRICH; SCHLESSINGER, 1990; AVRUCH, 1998). Quatro destes substratos pertencem à família dos substratos de receptor de insulina: IRS1, IRS2, IRS3 e IRS4. (BACKER et al., 1992). Entretanto no que diz respeito ao controle da glicemia os IRS1 e IRS2 possuem papel relevantes (ARAKI et al., 1994; WITHERS et al., 1998).

A jusante a fosforilação dos IRS, ocorre a ativação da enzima fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) em seus domínios SH2, provocando a dissociação de sua subunidade regulatória (p85) (MYERS et al., 1992). O que permite à subunidade catalítica (p110) ativar a fosforilação de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) e, conseqüentemente, a formação de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3) (ALESSI; DOWNES, 1998; SALTIEL; KAHN, 2001). A formação de PIP3 recruta duas cinases para membrana plasmática via domínio PH, a PKB também denominada AKT; uma cinase serina/ treonina altamente preservada de invertebrados a mamíferos que possui três isoformas AKT1, AKT2 e AKT3 e, a proteína cinase 1 dependente de fosfoinosítido (PDK1) que

consequentemente fosforíla a AKT em treonina 308 (SCHINNER et al., 2005; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

O sinal insulina/IR/PI3K/AKT coordena uma série de respostas celulares tecido dependentes, que participam do fluxo metabólico em direção ao anabolismo, dentre os vários mecanismos de ação destaca-se a atuação na homeostase glicídica (CARVALHO et al., 1996; PRADA et al., 2005; SONG et al., 1999) (Figura 5). Nos hepatócitos ela inibe gliconeogênese controlando a expressão de enzimas chaves nesta rota metabólica como: PEPCK e G6F; favorece a glicogênese fosforilando a GSK3 $\beta$  que, uma vez ativada deixa de inibir a glicogênio sintase incentivando a síntese de glicogênio hepático. (FRAME; COHEN, 2001; FRAYN, 2002).

Nos adipócitos e miócitos ela ativa a proteína TBC1D4, antes denominada AS160, que inicia uma série de mecanismos relacionados a translocação e inserção de transportadores de glicose GLUT4 à membrana celular, alterando sua permeabilidade, e aumentando a dinâmica de fluxo da glicose. Também desencadeia processos lipogênicos no tecido adiposo e de síntese e preservação de glicogênio muscular via GSK3 $\beta$ /glicogênio sintase (NEWSHOLME; DIMITRIADIS, 2001; BOGAN, 2012).



**Figura 5** -Representação parcial da via de sinalização insulínica.

Como demonstrado acima, os eventos intracelulares que ocorrem após o acoplamento ligante/receptor são extremamente específicos e, é extremamente necessário para a homeostasia o balanço entre a fosforilação e desfosforilação de proteínas que

regulam processos biológicos iniciados por efetores extracelulares como: hormônios, citocinas, neurotransmissores e outros (HARRISON S et al.; 1999).

Componentes da síndrome metabólica são considerados uns dos principais fatores que desencadeiam processos inflamatórios altamente relacionados a diminuição da sinalização insulínica. A ativação TLR-4 (*toll like receptors 4*) por ácidos graxos livres (AGL), lipopolissacarídeos (LPS) e, de receptores de citocinas por algumas adiponectinas como TNF- $\alpha$ , ativam mecanismos via JNK - IkK - IkK $\beta$  e fator de transcrição kB (NF-kB) aumentando a expressão gênica de citocinas inflamatória tornando esse um fenômeno de retroalimentação positiva, culminando com a fosforilação do IR e seus substratos 1-2 em serina, o que diminui a resposta intracelular a insulina (ZICK, 2004; BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Outro mecanismo de destaque é a hiperatividade de proteínas tirosinas fosfatases (PTPs) importantes reguladoras de eventos de sinalização celular dependente de fosforilação em tirosina, sendo a PTP1B a principal fosfatase envolvida no sinal da insulina (ELCHEBLY, M. et al.; 1999; HIRATA, A.E. et al.; 2003).

Entretanto, é importante ressaltar que existem outros mecanismos que podem colaborar para uma depressão nas respostas metabólicas iniciadas pela insulina e, uma convergência desses fatores podem contribuir para o quadro fisiopatológico de resistência à insulina. O fato é, a tolerância à glicose diminuída gera uma hiper resposta secretória pelo tecido pancreático, que a priori mantém os níveis glicêmicos, porém o avanço e progressão do quadro gera um ciclo vicioso, levando a falência das células beta e, promove a inabilidade da homeostase glicêmica e instalando-se o DM2 (WAJCHENBERG, 1992; DEMIDOVA, AMETOV, TITOVA, 2006; PRASAD, GROOP, 2015).

### **1.2.2 OUTRAS FORMAS DE DIABETES MELLITUS**

As outras formas de diabetes mellitus representam cerca de 10% dos casos diagnosticados, estão inclusos nesta categoria o diabetes mellitus tipo 1 caracterizado pela destruição progressiva das células betas pancreáticas, ocasionando deficiência absoluta na síntese e secreção de insulina, o diabetes gestacional, Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) uma forma monogénica da doença de origem autossômica dominante, algumas doenças endócrinas e neoplasias pancreáticas (GARDNER; TAI, 2012)



### 1.2.3 DIABETES MELLITUS E MELATONINA

A melatonina possui papel importante na regulação do metabolismo energético. Devido a seus efeitos cronobióticos, ela distribui adequadamente várias funções metabólicas, alocando a gliconeogênese hepática a períodos de repouso e, a secreção e sensibilidade à insulina a períodos de atividade, independentemente da espécie estudada. Vários trabalhos com roedores, demonstraram que ela é fundamental para adaptações metabolicamente estressantes como, exercício e jejum, assim como uma regulação normal do fluxo energético (CIPOLLA-NETO et al., 2014; LIMA et al., 1998; PICINATO et al., 2002a; ALONSO-VALE et al., 2004; BORGES-SILVA et al., 2005a e b, 2007)

A hiperglicemia periférica diminui drasticamente a síntese e secreção de melatonina pineal, tanto em animais diabéticos tipo I, (Amaral et al 2014), quanto no modelo experimental de diabetes tipo II do rato Goto Kakizaki (FRESE et al., 2009). Sendo assim, essa diminuição na produção de melatonina no diabetes, resulta, como consequência, num agravamento do quadro fisiopatológico. Além disso, o polimorfismo genético dos receptores de melatonina, está associado a um risco aumentado de desenvolver diabetes tipo 2. Foi relatado que variantes genéticas do MNTR1B, que codificam o receptor MT2, estão ligadas ao risco aumentado da doença (FORRESTEL et al., 2017).

Os trabalhos de Nogueira et al. (2011), determinaram que a remoção cirúrgica da pineal, alterou o ritmo endógeno da fosforilação proteína-treonina quinase (Akt), um marcador da atividade do receptor de insulina, e interrompeu a resposta hepática e muscular à insulina.

O tratamento terapêutico com melatonina tem demonstrado uma melhora neste cenário. Assim Montilla et al. (1998), Kanter et al (2006) em modelo diabético tipo I induzido por estreptozotocina, e Nishida et al (2002) em animais diabéticos tipo II, relatam em seus trabalhos uma melhora na hiperglicemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia, após a administração do hormônio. Além disso, Ramos-Lobo et al., 2015, mostraram que animais diabéticos tipo I induzidos por estreptozotocina, recompõe a ritmicidade circadiana, aumentado a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose após tratamento com melatonina. Semelhante à metformina, o hormônio pineal, pode aumentar a atividade da AMPK e, regular potencialmente a sensibilidade à insulina no fígado e músculo esquelético (RUI et al., 2016; FORRESTEL et al., 2017).

Notavelmente, a administração in vitro de melatonina protege as células beta dos efeitos deletérios da toxicidade da glicose, melhorando a sobrevivência das células beta e reduzindo as respostas ao estresse oxidativo nas células beta de roedores INS-1 832/13 e nas ilhotas humanas isoladas de indivíduos com diabetes tipo 2 (PARK et al., 2014). O tratamento crônico com melatonina também foi capaz de restaurar parcialmente a massa de células beta em um modelo de ratos com diabetes induzido por estreptozotocina (KANTER et al., 2006).

Em conjunto, esses estudos dão base a afirmação, de que, reduções na secreção de melatonina, promovem resistência à insulina e hiperglicemia, e que, essas condições podem ser corrigidas com a administração exógena de melatonina.

#### **1.2.4 DIABETES MELLITUS E EXERCÍCIO FÍSICO**

O músculo esquelético corresponde a 40% da massa corporal absoluta (SMITH AG, MUSCAT GE, 2005). Ele é responsável por cerca de 30% do consumo energético e, em condições fisiológicas representa 75% do clareamento da glicose no sangue (NUUTILA P, KOIVISTO VA et al 1992, KOISTINEN; ZIERATH, 2002, ZIERATH et al., 2000) A mais de um século, sabe-se que os processos de contração muscular, desencadeados pelo exercício físico, seja aeróbio ou anaeróbio, promove melhoras na homeostase glicêmica (CHAUVEAU A, KAUFAMANN M, 1987) Neste sentido, o exercício físico é uma das principais modalidades terapêuticas para o diabetes tipo II. Lamentavelmente, e, com demasiada frequência, é um tratamento subutilizado. As modificações favoráveis na tolerância à glicose e na sensibilidade à insulina em geral se perdem com 24h após a última sessão de exercícios; conseqüentemente, o treinamento regular é imperativo, para preservar os efeitos de redução da glicemia, e, promover uma melhor sensibilidade à insulina. (MCARDLE et al, 2015).

Estudos em roedores e humanos evidenciaram que, atividade aeróbia a 75% do VO<sub>2</sub> máximo foi capaz de aumentar a fosforilação em tirosina do IRS1 e IRS2 e, a associação dessas proteínas com PI3K no músculo gastrocnêmio após o estímulo com insulina (Da Luz G et al., 2011). Além disso, outros trabalhos observaram uma maior fosforilação em serina da AKT, proteína fundamental para promover a translocação do GLUT4 para a membrana citoplasmática (WOJTASZEWSKI; RICHTER, 2006).

Além dos efeitos desencadeados na musculatura esquelética, o exercício físico promove adaptações favoráveis ao metabolismo da glicose em vários outros tecidos, como: fígado, tecido adiposo e pâncreas. Recentemente e, de forma elegante, Ana B.A.

Wagner et al, (2019) e Joji Kusuyama et al, (2019), mostraram em seus trabalhos que, o treinamento físico em ratas prenhas, evoca adaptações epigenéticas, preservando a sensibilidade a insulina quando a prole era submetidas a dieta hiperlipídica.

Vários mecanismos moleculares então envolvidos na resposta do exercício físico ao metabolismo energético e sensibilidade à insulina, alguns permanecem subjacentes, outros, como a ativação de um importante sensor energético intracelular, a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), é melhor elucidado pela luz da ciência. A AMPK, uma proteína heterotrimérica que contém uma subunidade catalítica  $\alpha$  e duas subunidades regulatórias  $\beta$  e  $\gamma$  é ativada pelo processo de contração muscular (HARDIE, 2003) Os efeitos da ativação da AMPK são observados nos principais tecidos metabolicamente relevantes, como fígado, músculo esquelético, adiposo.(BEI B.ZHANG et al.,2009). Ela regula negativamente processos de biossíntese que consomem ATP, incluindo gliconeogênese, síntese de lipídios e proteínas.

A fosforilação desta molécula ativa vias celulares que, promovem o transporte de proteínas GLUT4 para superfície da membrana celular, no músculo esquelético e tecido adiposo (PAULI et al.,2007). Além disso, a ativação da AMPK inibe a atividade acetil-Coa carboxilase (ACC) que está envolvida em eventos metabólicos determinantes para o controle da produção hepática de glicose e, metabolismo do glicogênio no músculo e fígado (BARNES; ZIERATH, 2005; SHAW et al, 2005).

A resistência à insulina, por muitas vezes, está associada à disfunção mitocondrial muscular em indivíduos diabéticos tipo 2 (KELLEY et al., 2002). Neste sentido, um importante alvo da AMPK, é a modulação de uma molécula da família da sirtuínas, a SIRT1. A SIRT 1 está envolvida em mecanismos pós-transcricionais de deacetilação, importantes para o balanço glicêmico e biogênese mitocôndrial via PGC1- $\alpha$  (JORGENSEN S.B; RICHTER E.A; WOJTASZEWSKI J.F, 2006).

Outro possível alvo terapêutico da atividade física via AMPK é o tecido pancreático. A morfologia das células  $\beta$  pancreáticas, em ratos pré-diabéticos, era quase normal nos animais exercitados ou tratados com AICAR por oito semanas, indicando que, a ativação crônica da AMPK in vivo pode preservar a função das células  $\beta$ . (RASMUS POLD et al., 2005)

A inflamação crônica, oriunda do excesso de adiposidade, exerce papel de destaque na resistência insulínica, os mecanismos moleculares envolvidos apontam para alterações nas etapas iniciais da via de sinalização, que, envolvem à fosforilação de seu receptor e substratos em serina (DANDONA P et al, 2004)

Evidências científicas vem demonstrando que o treinamento físico promove uma diminuição deste processo inflamatório (PETERSEN AM, PEDERSEN BK, 2005). As proteínas intracelulares JNK, I $\kappa$ K, I $\kappa$ K- $\beta$  e, fator de transcrição NF- $\kappa$ B estão no centro da resposta celular ao estresse inflamatório (HOTAMISLIGIL GS et al., 1996) Após ser ativada a I $\kappa$ K pode diretamente fosforilar IRS-1 em resíduos de serina, atenuando a atividade de tirosinas (DEFRONZO RA, TRIPATHY D, 2009). A fosforilação de I $\kappa$ B, forma cadeias de poliubiquitinas que, então, induzem sua degradação proteossomal, liberando assim, a migração do fator de transcrição  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) ao núcleo celular que, se liga ao DNA e induz a transcrição gênica de mediadores inflamatórios como TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) e IL-6 (interleucina 6) (BARMA P, et al 2009). Em animais obesos alimentados por dieta hiperlipídica, uma sessão aguda de natação diminuiu a fosforilação da JNK, bloqueou a via I $\kappa$ K/NF $\kappa$ B, reduzindo a fosforilação do IRS-1 em serina (ROPELLE E.R et al, 2007).

Neste sentido, a ativação de diversos mecanismos fisiológicos produzidos pelo exercício físico, culmina em um espectro de efeitos metabólicos benéficos, com o potencial de melhorar os mais variados distúrbios associados ao diabetes mellitus tipo 2.

## 2 JUSTIFICATIVA

O animal Goto Kakizaki (GK) é considerado um modelo experimental para o estudo do diabetes tipo II, desenvolvidos a partir do cruzamento de animais Wistar que apresentavam intolerância à glicose. Os ratos Goto Kakizaki apresentam hiperglicemia de jejum acima de 126 mg/dl a partir da 10ª semana de vida, como também níveis séricos elevados para triglicerídeos e colesterol e resistência à insulina (GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1975, 1976). Outro aspecto importante é que a hiperglicemia periférica diminui drasticamente a síntese e secreção de melatonina pineal nesses animais (FRESE, et al., 2009).

Sabe-se da importância funcional da melatonina pineal e o metabolismo energético. Zanquetta et al. (2003) mostraram que, animais pinealectomizados desenvolveram resistência à insulina e diminuição na expressão gênica e proteica de GLUT4, no entanto, a reposição diária noturna de melatonina nesses animais provocou a reversão completa do quadro induzido pela pinealectomia. Os trabalhos de Anhê et al., (2004) e Picinato et al., (2008) evidenciaram que a melatonina melhora diretamente toda cascata de sinalização entre a ativação do receptor de insulina, fosforilação do IRS-1 associações IRS-1/PI3 quinase e IRS-1/SHP-2, além de fosforilação da AKT.

Além disso, no que tange a homeostasia glicídica o treinamento físico é considerado uma terapia não farmacológica no tratamento do diabetes tipo 2. Os efeitos agudos e crônicos do exercício físico sobre o metabolismo dos carboidratos proporcionam as razões fisiológicas pelas quais uma relação entre a atividade física e a tolerância à glicose é biologicamente plausível (MCARDLE et al, 2015).

Portanto, considerando que a hiperglicemia proporciona uma queda na síntese e secreção da melatonina pineal e, tal hormônio está diretamente ligado ao metabolismo energético e sensibilidade à insulina e, que o exercício físico é uma potente terapia não farmacológica em distúrbios metabólicos, a proposta do presente estudo é avaliar o efeito sinérgico da suplementação com melatonina e as respostas adaptativas do treinamento físico aeróbio na sensibilidade à insulina em animais Goto Kakizaki, espontaneamente diabéticos tipo II.

### **3 OBJETIVOS**

O presente estudo tem por objetivo, avaliar se a suplementação com melatonina e o treinamento físico aeróbio por 12 semanas é capaz de melhorar a homeostasia glicêmica em animais espontaneamente diabéticos do tipo II (Goto Kakizaki).

#### **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar as alterações do quadro metabólico e da sensibilidade à insulina de animais do modelo de diabetes tipo II (Goto kakizaki) através:

- da avaliação do perfil lipídico e da homeostase glicêmica;
- da avaliação do conteúdo de glicogênio muscular e hepático;
- da avaliação da morfologia muscular;
- da avaliação de genes e proteínas envolvidas na captação de glicose durante o exercício e da sinalização de insulina na musculatura esquelética (sóleo e extensor digital longo, EDL);
- da avaliação das principais proteínas envolvidas na neoglicogênese e glicogênese hepática;
- da avaliação da produção de melatonina e insulina.

### **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 60 ratos da linhagem Goto Kakizaki com aproximadamente 3 meses de idade e média de 300g de peso corporal. Os animais foram mantidos no biotério com ciclo claro-escuro de 12h/12h e temperatura controlada de  $21 \pm 2$  °C, recebendo água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do ICB.

#### **4.2 DESENHO EXPERIMENTAL**

Os animais foram divididos em quatro grupos: Goto Kakizaki sedentários; Goto Kakizaki sedentários e tratados com melatonina; Goto Kakizaki treinados; Goto Kakizaki treinados e tratados com melatonina. Os animais tratados com melatonina receberam 3

mg/kg corporal durante 3 meses, somente durante a escotofase. Este desenho experimental está representado na figura 6.

#### **4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM MELATONINA**

Os grupos GK sedentário+Mel e GK+T+Mel receberam melatonina na água de beber por 12 semanas. A melatonina (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) foi preparada diariamente dissolvendo 0,25g de melatonina em 1mL de etanol (100%, v/v) e, diluição adicional desse volume em 249mL de água destilada. Baseado na ingestão hídrica e peso corporal de cada animal, a concentração final de melatonina (1mg/Kg de animal) foi diariamente adicionada na água de beber e oferecida apenas durante 12 horas da fase escura do ciclo claro-escuro, de acordo com os grupos aos quais os animais pertencem. No início do período de 12 horas de claro as garrafas de água foram substituídas por novas garrafas com água livre de melatonina. Os animais pertencentes aos grupos supracitados receberam 3mg de melatonina/Kg de animal, ao longo de 12 semanas.

## ESQUEMA DO DESENHO EXPERIMENTAL

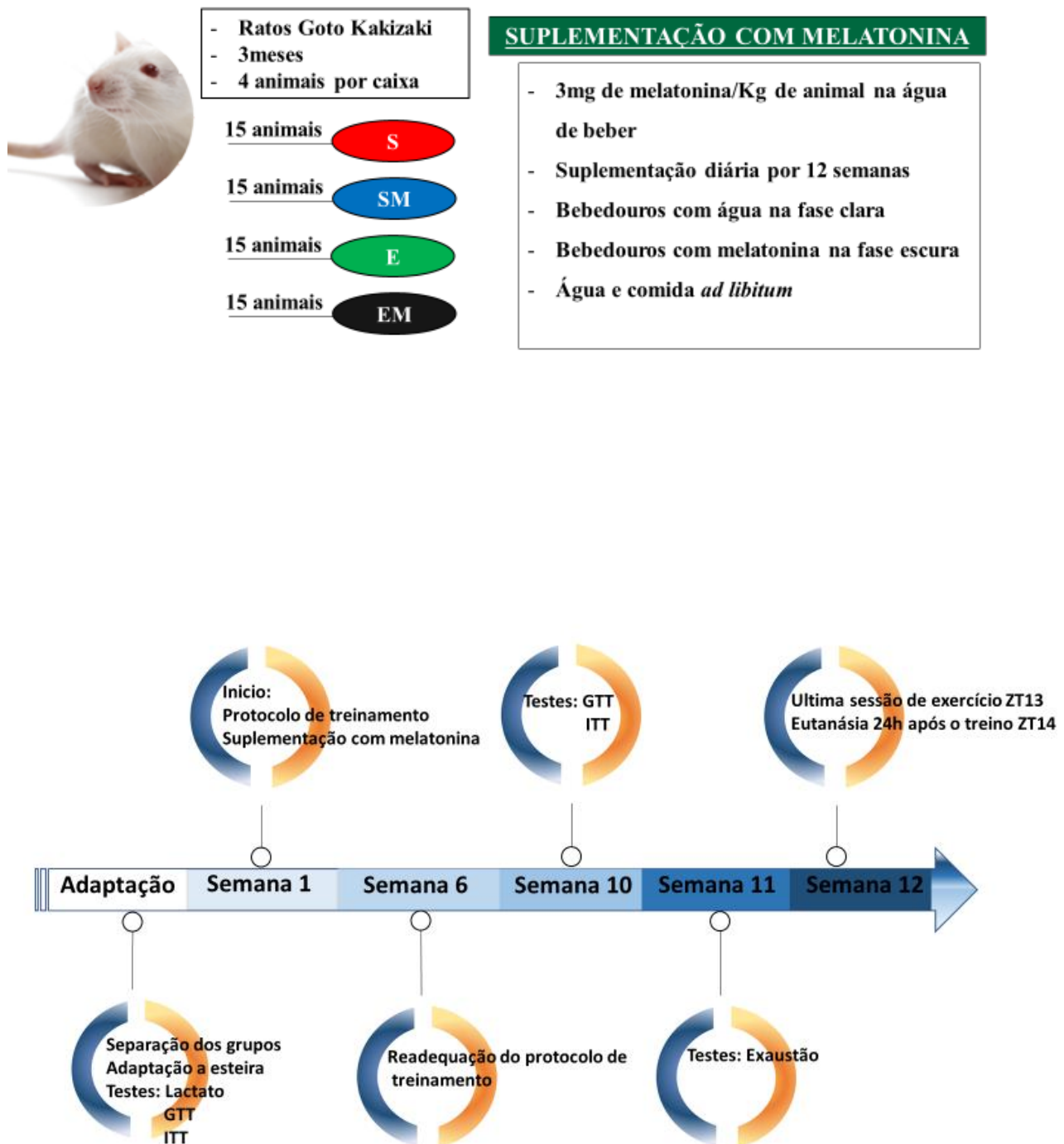


Figura 6 – Esquema representativo do desenho experimental.



#### 4.4 PROTOCOLO DO TREINAMENTO FÍSICO

O treinamento físico dos animais teve duração de 12 semanas, 5 vezes por semana, e foi realizado em esteira ergométrica programável, adaptada para treinar 12 ratos simultaneamente. O protocolo utilizado foi adaptado de (MENDES et al, 2013).

Antes de começar o período de treinamento, os ratos dos grupos treinados foram adaptados à esteira durante uma semana, 10 minutos por dia, em velocidade baixa (0,5 km/h). A periodização do treinamento contou com aumentos graduais de intensidade de esforço e volume, definidos por: velocidade e tempo de exercício, conforme indicado na figura 7. O protocolo não incluiu alterações na inclinação da esteira. A intensidade de treinamento ocorreu aproximadamente entre 50-80% do limiar anaeróbio, como demonstrado na figura 7.

Para que não ocorressem alterações no horário do pico noturno da secreção de melatonina, atraso ou adiantamento de fase devido ao exercício, (BUXTON; HERMITE-BALERIAUX; HIRSCHFELD, 1997) os animais foram treinados em horários aleatórios, sempre no período de escuro do ciclo de iluminação ambiental, por ser o período circadiano de atividade dessa espécie.

Semanas	Adp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Velocidade (Km/h)</b>		0,5	0,6	0,6	0,7	0,8	0,9	1	1	1,1	1,2	1,3	1,3
<b>Tempo (min)</b>	10	10	15	20	20	30	30	35	35	40	40	40	40

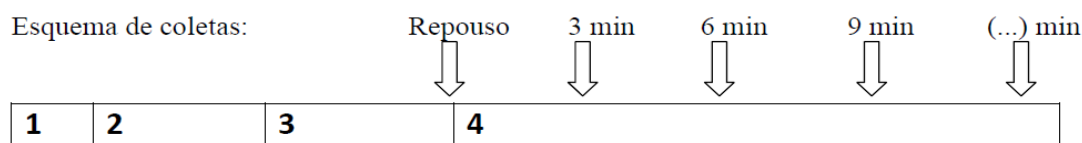
**Figura 7**-Fonte: Adaptado de Mendes et al. (2013)

#### 4.5 TESTE DO ESFORÇO MÁXIMO

A eficiência do protocolo de treinamento físico foi avaliada por meio do teste de esforço máximo realizado no início e no fim do protocolo. O teste consistiu em exercício escalonado na esteira com acréscimos da velocidade em 5 m/min por 3 minutos, sendo esta carga incrementada em 5 m/min a cada 3 minutos até que o animal atingisse a exaustão (BROOKS; WHITE, 1987).

#### 4.6 TESTE DO LACTATO

Para a determinação do limiar de lactato, os animais foram submetidos a um teste escalonado em esteira rolante com incremento da velocidade até a exaustão. Concomitantemente, foi realizada a coleta de sangue da cauda do animal e analisadas amostras de plasma por método enzimático (Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa MG Brasil.), conforme o esquema respresentado na figura 8.

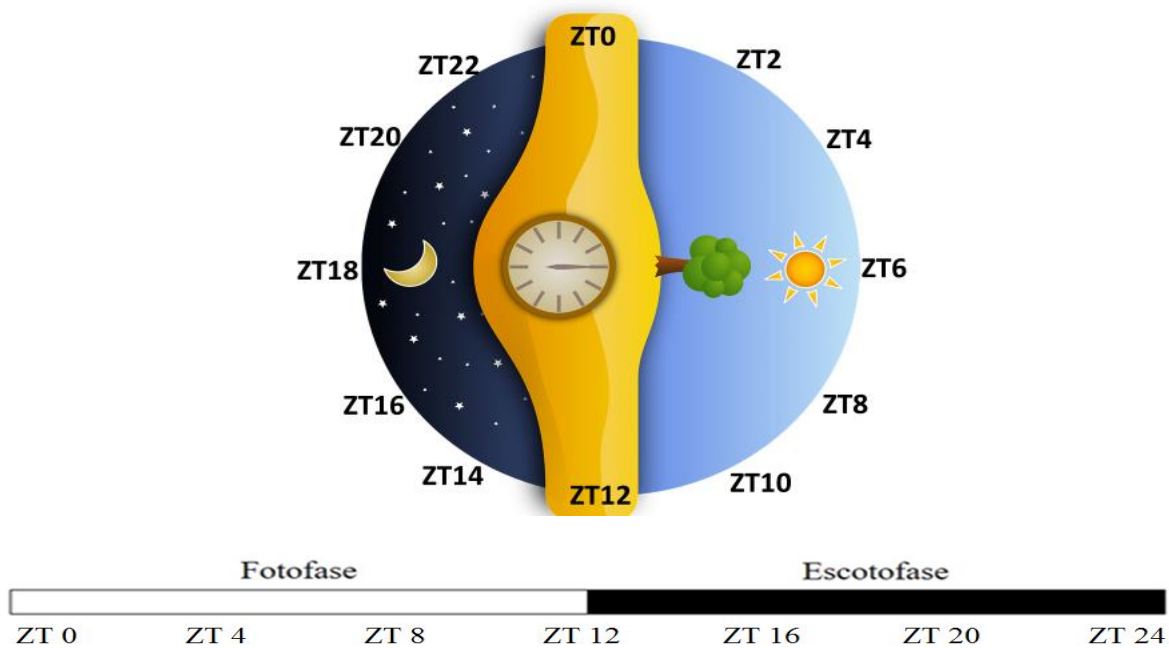


**Figura 8**-Fonte: Teixeira, 2000

1. corte da cauda.
2. deambulação por 10 minutos para circulação e remoção do lactato produzido devido ao estresse do corte da cauda.
3. repouso de 10 minutos e coleta de sangue ao final deste período para determinação da concentração de lactato em repouso.
4. teste de velocidade progressiva até a exaustão: protocolo escalonado com incrementos de 5 m/min a cada 3 minutos (velocidade inicial 5 m/min). A coleta do sangue foi realizada aos 20 segundos finais de cada carga até a exaustão do animal. (TEIXEIRA, 2010).

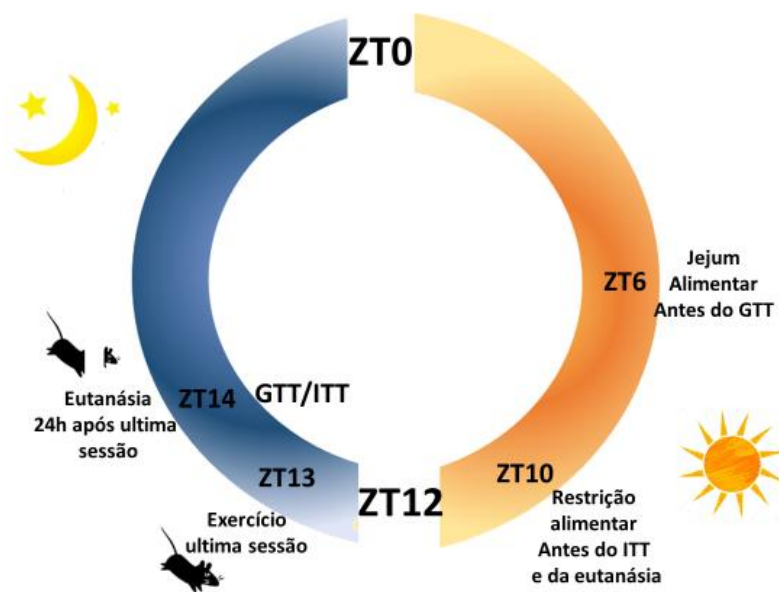
Após o protocolo de treinamento e suplementação, como já mencionado, os animais foram eutanasiados 24h após a última sessão de exercício conforme a Figura 9 e Figura 10.

## REPRESENTAÇÃO CIRCADIANA DOS ZTS



**Figura 9-**Representação do *Zeitgeber Times* (ZTs) ao longo das 24 horas e sua relação com a fase luminosa.

## REPRESENTAÇÃO DOS ZTS DO DESENHO EXPERIMENTAL



**Figura 10-**Representação do *Zeitgeber Times* (ZTs) do protocolo experimental.

A última sessão de exercício físico ocorreu no ZT13 com os animais alimentados. Após 24h da última sessão de treinamento eles foram eutanasiados no ZT14. Os tecidos coletados foram armazenados em freezer -80°C para serem posteriormente submetidos à análise experimental.

Foram realizados os testes de tolerância à glicose e à insulina (GTT, ITT). Foi também avaliada a sensibilidade à insulina 24 horas após a última sessão de treinamento físico por meio do estudo dos principais genes envolvidos na sinalização do receptor de insulina na musculatura esquelética (sóleo e extensor digital longo), sendo elas o GLUT4, IR, IRS-1 e 2, PI3K, AKT, GSK-3 $\beta$ , assim como da AMPK. A sinalização da insulina no fígado também foi avaliada através dos genes GLUT2, IR, IRS-1 e 2, PI3K e AKT, e a sua capacidade neoglicogenética foi avaliada através da PEPCK e FOXO1, a glicogênese através da GSK3B. Por fim, foi realizada a histologia do tecido pancreático para análise morfológica.

#### **4.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA**

Tanto consumo alimentar como peso corporal, em gramas, de todos os animais foram avaliados semanalmente durante todo o período experimental.

#### **4.8 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)**

O teste de tolerância à glicose foi realizado no ZT10, sendo esse o melhor período para o teste de acordo com informações prévias deste grupo de pesquisa. Uma primeira coleta de sangue foi feita por meio de um corte na extremidade da cauda de cada animal (tempo 0) e, na sequência, foi injetada intraperitoneal uma solução de glicose na proporção de 2 g/kg de peso corporal. As amostras de sangue foram coletadas nos tempos de 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a injeção.

O procedimento para aferição da glicemia consistiu em obter uma gota de sangue da ponta da cauda dos animais, e colocá-la na tira reagente (Optium Blood Glucose Test Strips, Medisense<sup>®</sup>, United Kingdom) conectada ao glicosímetro Optium Xceed<sup>®</sup> (Medisense<sup>®</sup>, United Kingdom) que afere a glicemia após 5 segundos. Para análise matemática desse parâmetro foi utilizado a área sob a curva (AUC).

#### **4.9 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA (ITT)**

O teste de tolerância à insulina foi realizado no ZT10 com os animais em privação alimentar de 4 horas. A primeira coleta (tempo 0) de sangue caudal para aferição da glicemia, conforme descrita acima, foi realizada antes da injeção intraperitoneal de insulina (0.5 UI/Kg) e coletas subsequentes foram realizadas nos tempos 5, 10, 15, 20 e 25 minutos. Para análise matemática desse parâmetro foi utilizado a constante de decaimento à partir do tempo 5 (kITT).

## **5. DOSAGENS SÉRICAS HORMONAIS E METÁBOLICAS**

As amostras de sangue (soro e plasma) dos animais foram coletadas para dosagem de insulina, melatonina e perfil lipídico.

Nos dias correspondentes à eutanásia, o sangue foi coletado da veia cava inferior, após 10 horas de jejum, em tubos de vácuo sem e com anticoagulante (EDTA) (BD Vacutainer<sup>®</sup>, BD Franklin Lakes, NJ, USA). Em seguida, o sangue foi centrifugado por 15 minutos a 2000 rpm em temperatura ambiente para obtenção do soro/plasma.

Além disso, uma pequena fração do soro ou plasma foi coletado e destinado para medidas do perfil lipídico: 1) colesterol total (colesterol liquiform, Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil), 2) HDL (colesterol HDL, Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil) e 3) Triglicérides (triglicérides liquiform, Labtest Diagnóstica S.A, Lagoa Santa, MG, Brasil) por meio de kits, conforme especificações do fabricante. Com base nos resultados de colesterol total, HDL e triglicérides, foi calculado a fração de colesterol LDL por meio da fórmula de Friedewald onde:  $LDL = \text{colesterol total} - \text{colesterol HDL} - (\text{triglicérides}/5)$ .

### **5.1 VIA DE SINALIZAÇÃO INSULÍNICA ESTIMULADA**

Conforme descrito por Zanuto et. al (2013), a via insulínica estimulada foi realizada nos animais anestesiados após uma injeção intraperitoneal com cloridrato de xilazina (Dorcipec, Vallée Produtos Veterinários, Brasil – 40mg/Kg i.p.) e cloridrato de quetamina (Dopalen, Divisão Vetbrands Saúde Animal, Brasil – 40mg/Kg i.p.). A cavidade abdominal foi aberta e o fígado, sóleo, EDL e tecido adiposo branco periepididimal foram coletados, marcando assim o tempo 0. Com os tecidos coletados e a cavidade abdominal aberta, a veia porta hepática foi exposta, recebendo uma injeção de insulina regular (2 UI/Kg) diluída em uma solução de salina (NaCl 0,9%). Após 30 segundos da aplicação da insulina para o fígado, 120 segundos para o sóleo, 150 segundos

para o EDL e 180 segundos para o tecido adiposo periepididimal os tecidos foram novamente coletados, sendo este o tempo após estímulo com a insulina.

## 5.2 CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

Para o ensaio de extração de glicogênio hepático e muscular foi utilizado o método colorimétrico conforme segue. Para homogeneização, tanto de músculo sóleo e EDL como de fígado, pesou-se 100 mg de tecido o qual foi transferido para um tubo falcon de 15ml contendo 1ml de KOH 30%. As amostras foram mantidas por 60 minutos em água fervente, ao final de 60 minutos os tubos foram ligeiramente agitados.

Em seguida, foi adicionado 100µl de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em solução saturada e agitado no vórtex por 10 segundos. Então foi adicionado 3,5ml de etanol 70% e deixado em água fervente por 15 minutos, ao final o conteúdo foi novamente agitado no vórtex por 10 segundos e centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente. Por fim, foi separado, o sobrenadante, e repetida a lavagem com etanol, a fervura por 15 minutos com agitação no vórtex, a centrifugação conforme parâmetros supracitados e a retirada do sobrenadante. O conteúdo final foi ressuspensionado em 1ml de água destilada levemente aquecida.

Após a extração de glicogênio dos tecidos de interesse, foram pipetados 50 µl de H<sub>2</sub>O em 200µl de Antrona 2% diluída em ácido sulfúrico absoluto, para correção pelo branco. Em seguida, foi pipetada a curva padrão de glicose, em duplicata, nas concentrações de 0.06; 1.1; 2.2; 3.3; 4.4 mmol/L (50 µl do padrão e 200 µl de Antrona). Por fim, foram pipetadas 50µl de cada amostra em 200µl de Antrona e mensuradas em espectrofotômetro no filtro de 650nm. O resultado final foi apresentado em mg/g de tecido após submeter os valores colorimétricos ao seguinte cálculo:

$$\frac{1}{MT \text{ (mg)}} \times \frac{\{A(\text{mL}) + H_2O(\text{mL})\}}{A \text{ (mL)}} \times \frac{\sum \{P(\text{ug/ml})\}}{\sum \text{Abs P - branco}} \times \frac{100}{1000} \times 10$$

## 5.3 ANÁLISE PROTEICA - IMUNOBLOTTING

Após a coleta, os tecidos foram homogenizados em tampão RIPA (Sigma) enriquecido com coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (1:100, Sigma). As amostras foram centrifugadas por 20 minutos à 14.000 rpm, o sobrenadante foi separado e o conteúdo proteico foi dosado usando-se uma solução para ensaio colorimétrico (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific). Após quantificação, 30µg de proteínas foram

submetidas à eletroforese em gel de acrilamida (12% SDS-PAGE) e, em seguida, foram eletro-transferidas para membranas de nitrocelulose.

Após a transferência e os ciclos de lavagens, foi feito o bloqueio durante a noite em solução TBS-T com 5% de BSA sob agitação constante a 4°C. Posteriormente, seguiu-se com 3 lavagens seriadas de 10 minutos cada e então, as membranas foram incubadas overnight à 4°C sob agitação constante com os anticorpos primários de interesse em 3% de BSA diluído em TBS-T (25 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,1% de Tween 20). Após 3 ciclos de lavagens de 10 min cada, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IRDye 800CW ou IRDye 680CW determinado pelo anticorpo primário (1:10,000, Li-COR) durante 60 minutos, diluído em TBS-T. Após 3 ciclos de lavagens de 10 min as proteínas foram visualizadas e analisadas utilizando o sistema Odyssey (Li-COR). As expressões proteicas foram normalizadas de acordo com a proteína constituída escolhida e testada para cada tecido.

#### **5.4 EXTRAÇÃO DE RNA**

As amostras foram imediatamente colocadas no reagente Trizol® (1000 µL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para extração do RNA total de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram homogeneizadas no reagente com auxílio do Politron, até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente e acrescida de 200 µL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha), 12.000 g, 15 minutos, à 4 °C e o RNA contido na fase aquosa foi transferido para outro tubo e precipitado com 500 µL de isopropanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA).

Em seguida as amostras foram centrifugadas (12.000 g, 10 minutos, 4 °C) para formação do precipitado e o sobrenadante foi descartado. O RNA total precipitado foi lavado com etanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) 75% e ressuspendido em H<sub>2</sub>O deionizada previamente tratada com DEPC. Os volumes de H<sub>2</sub>O utilizados variaram de acordo com o tecido.

Antes de sua utilização, uma amostra de cada extração foi quantificada e analisada, quanto à pureza e integridade, por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) que analisa 1 µL da amostra nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm e determina a sua concentração em ng/µL, além da razão 260/280 que é um indicativo da qualidade do RNA extraído.

Amostras com razão 260/280 entre 1,80 e 2,00 foram utilizadas nos procedimentos subsequentes.

### **5.5 OBTENÇÃO DE cDNA**

Amostras de 1 µg de RNA total tratado com DNase foram submetidas à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto foi adicionado a cada amostra: tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>), DTT (10 mM), mistura de dNTPs (10 mM cada), primers randômicos (150 ng), inibidor de RNase (40U) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 20 µl. As reações foram incubadas no termociclador MyGene™ Series Gradient (LongGene®, China) por 5 minutos à 65 °C, seguida de 10 minutos à 25 °C, com aquecimento para 42 °C por 75 minutos e 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20 °C.

### **5.6 ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) EM TEMPO REAL**

As amostras foram descongeladas em gelo e diluídas dez vezes em água Ultra-Pure™ Distilled Water (Gibco, EUA) para que chegassem à concentração de 5 ng/µL de cDNA. Para a preparação das placas que foram utilizadas na corrida de PCR em tempo real foram pipetados em cada poço 0,96 µL de amostra e também 5,04 µl do mix, composto por: 3 µl de Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), 1,56 µl de água Ultra-Pure, 0,24µl de cada primer (sense e antisense) com concentração de 10 µM, por cada gene investigado (volume final por poço de 6 µl).

O equipamento utilizado foi o QuantStudio 6 (Applied Biosystem, EUA) e os resultados obtidos das amostras após a reação de polimerase em cadeia em tempo real foram normalizados pela média entre três ou cinco genes constitutivos.

## **6. PREPARO DO TECIDO PANCREÁTICO**

As amostras de tecido pancreático utilizadas para processamento histológico foram emblocadas em parafina ou congeladas em (N<sub>2</sub>) líquido, e armazenados até seu processamento.

Para a obtenção de cortes, o tecido pancreático foi submetido à inclusão em parafina, foi realizada a microtomia em microtômo de parafina (Microtomo Spencer 820, American Optical Corporation, Buffalo, NY, EUA), com a posterior coleta de cortes com



20 µm de espessura em lâminas silanizadas (10 séries/amostra). As lâminas foram armazenadas em recipientes apropriados até o momento da realização da etapa de escorrimento da parafina e desparafinização, para posterior submissão às técnicas de coloração e imuno-histoquímica.

### **6.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA (H&E)**

Lâminas com cortes de tecido pancreático foram submetidas à coloração de H&E com o intuito de analisarmos a integridade histológica do tecido. Para a realização da coloração, as lâminas foram colocadas em estufa para o escorrimento do excesso de parafina, por 2 horas, a 60 °C. Em seguida, as lâminas passarão pelas etapas de desparafinização e coloração H&E: 30 minutos em xilol I; 15 minutos em xilol III e xilol III; 10 minutos em xilol + álcool etílico 100% (1:1); 5 minutos em série decrescente de álcoois: 100% I, 100% II, 100% III, 95%, 80%, 70%; 10 minutos em água corrente; imersão em tampão TBS; 6 minutos em solução de hematoxilina de Harris em meio aquoso; 10 minutos em água corrente; imersão em solução de água amoniacal; imersão em água destilada; 8 minutos em solução de eosina; imersão rápida em álcool etílico 70%; 5 minutos em solução crescente de álcoois: 85%, 95%, 100% II, 100% I; 5 minutos em xilol II e xilol I; meio de montagem e lamínulas de vidro. A análise foi em microscopia de luz e os parâmetros analisados foram: Circularidade.

### **6.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA INSULINA**

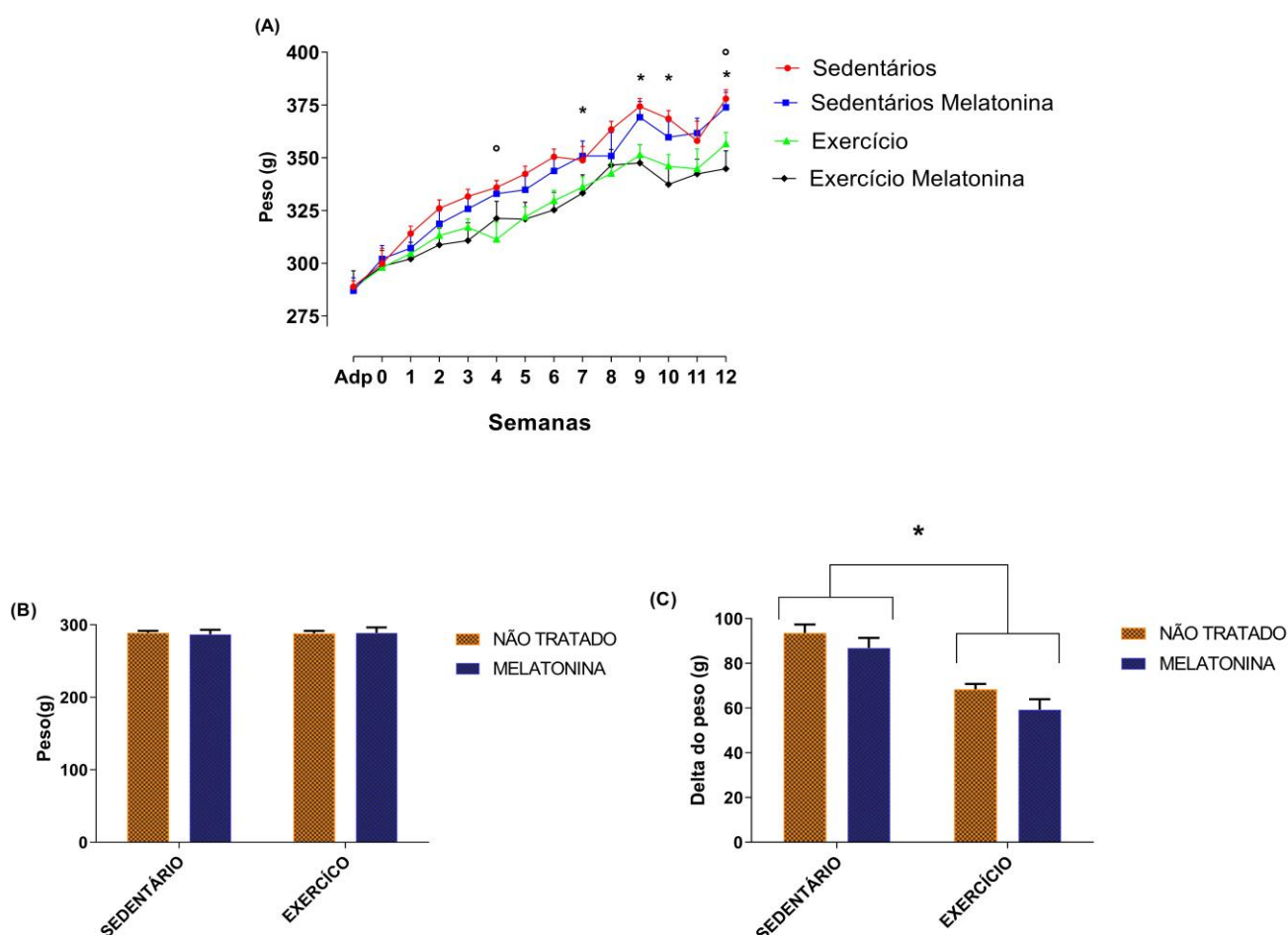
Uma série de cortes de tecido pancreático foram lavados gentilmente em solução de KPBS 3 x 5 minutos; realização de bloqueio com solução constituída de 3% soro normal de coelho em KPBS “loaded” por 1 hora em câmara úmida, a temperatura ambiente. Incubação em solução constituída de anticorpo primário anti-insulina 1:150 (Santa cruz, #sc-57342) em câmara úmida, a 4 °C por aproximadamente 48 horas. Em seguida, os cortes foram lavados 3 x 5 minutos em KPBS e incubados em solução de anticorpo secundário conjugado a Cy3 (Thermo fisher) por 2 horas, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Os cortes foram lavados 3 x 5 minutos em KPBS, corados com marcador nuclear DAPI (1:10,000) por 15 minutos, seguida de lavagens em KPBS 3 x 5 minutos. As lâminas foram cobertas com meio de montagem Prolong Antifade (Molecular Bioproducts) e lamínulas de vidro. As imagens foram feitas em microscopia de fluorescência

## **7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A análise estatística foi realizada por análise do teste t, ANOVA de uma via, ANOVA de duas vias, conforme o desenho experimental. As eventuais diferenças encontradas foram avaliadas pelo pós-teste de Tukey, prefixando-se o nível de significância em 95% ( $p < 0,05$ ). Os valores foram representados como médias  $\pm$  E.P.M (erro padrão da médias). Os testes estatísticos foram realizados mediante o programa GraphPad Prism, v.7.3.

## 8. RESULTADOS

Inicialmente os animais foram distribuídos de forma que todos os grupos possuíssem uma média equivalente do peso corporal. Figura 11 (B). O peso corporal dos animais foi avaliado semanalmente ao longo de todo período do protocolo experimental. Figura 11(A). No final das 12<sup>o</sup> semanas de tratamento a diferença de ganho de peso entre os grupos foi calculada pelo delta (peso final menos o peso inicial). Houve diferença entre os animais exercitados em comparação aos sedentários, não havendo diferença entre os grupos que receberam tratamento com melatonina, como demonstrado na figura 11 (C).

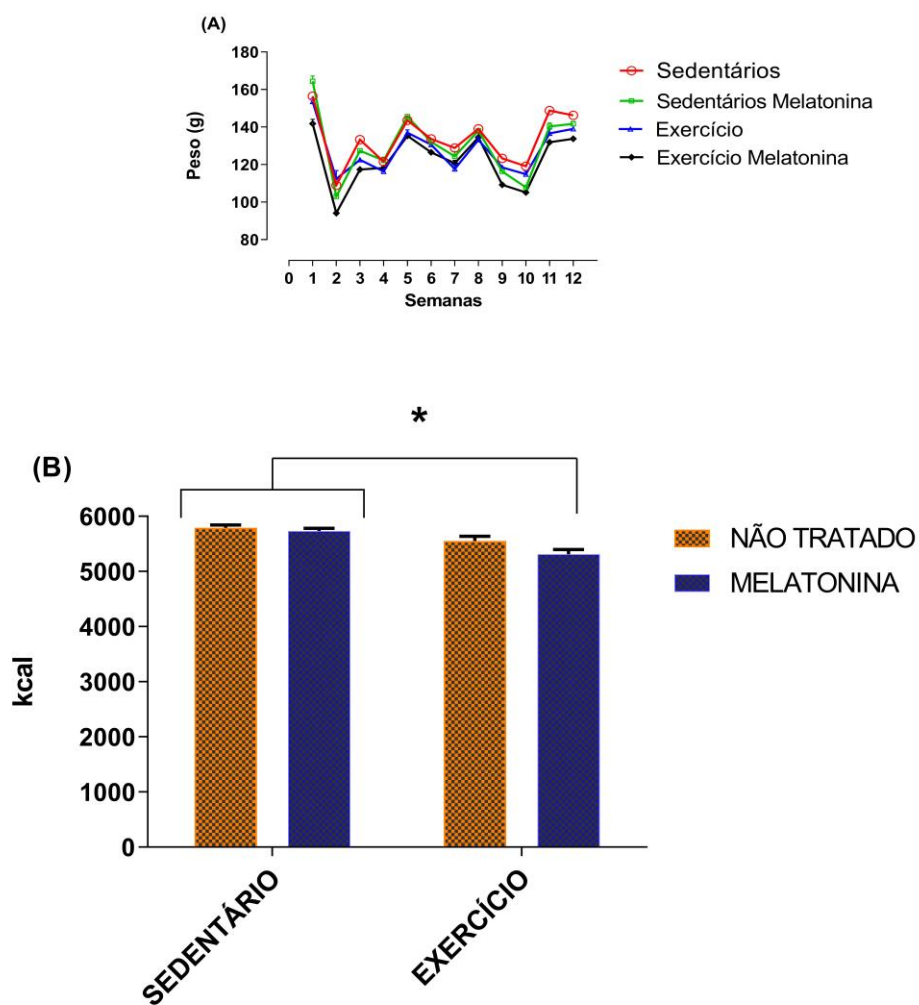


**Figura 11(A)**-Evolução do peso corporal ao longo das 12 semanas do protocolo experimental. ° exercício vs sedentários, \*exercício melatonina vs sedentários, ( $p < 0,001$ ). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 11(B)**-Peso corporal de todos os grupos no início do protocolo experimental. Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 11(C)**-Delta ( $\Delta$ ) do peso corporal dos animais. \* vs sedentários,  $p < 0,05$ . Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

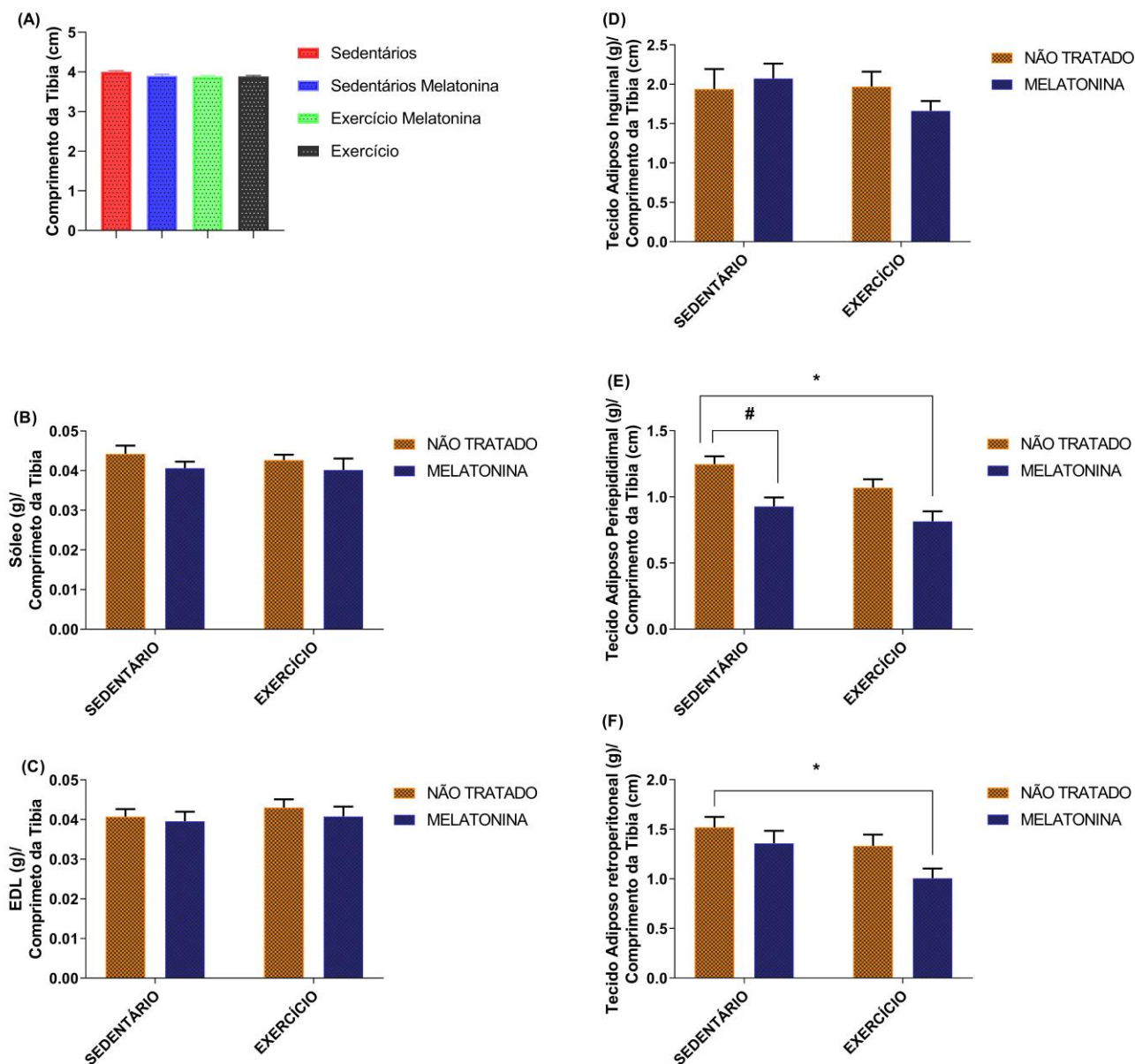
O consumo alimentar foi mensurado semanalmente. Figura 12 (A). Ao final do protocolo experimental o consumo total em gramas foi transformado em Kcal e, os animais exercitados tratados com melatonina, apresentaram menor consumo alimentar em relação aos grupos sedentários, com ou sem tratamento com melatonina. Figura 12 (B).



**Figura 12 (B)**-Consumo alimentar total dos animais ao final do protocolo experimental. \*vs sedentários ( $p < 0,05$ ) Valores expressos em kcal, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias.  $n=14$ .

Após a eutanásia, os músculos sóleo e edl, foram pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia, não havendo diferença entre os grupos. Figura 13(B e C). Os coxins adiposos inguinal, periepididimal e retroperitoneal, também foram extraídos, pesados e normalizados pelo comprimento da tíbia. O treinamento físico e o tratamento com

melatonina produziram uma diminuição da massa adiposa, principalmente no tecido periepididimal. Figura 13 (D, E e F).



**Figura 13(A)**-Comprimento da tíbia em (cm). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de uma via (n=14).

**Figura 13(B)**-Músculo sóleo úmido em (g) / pelo comprimento da tíbia em (cm). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias (n=14).

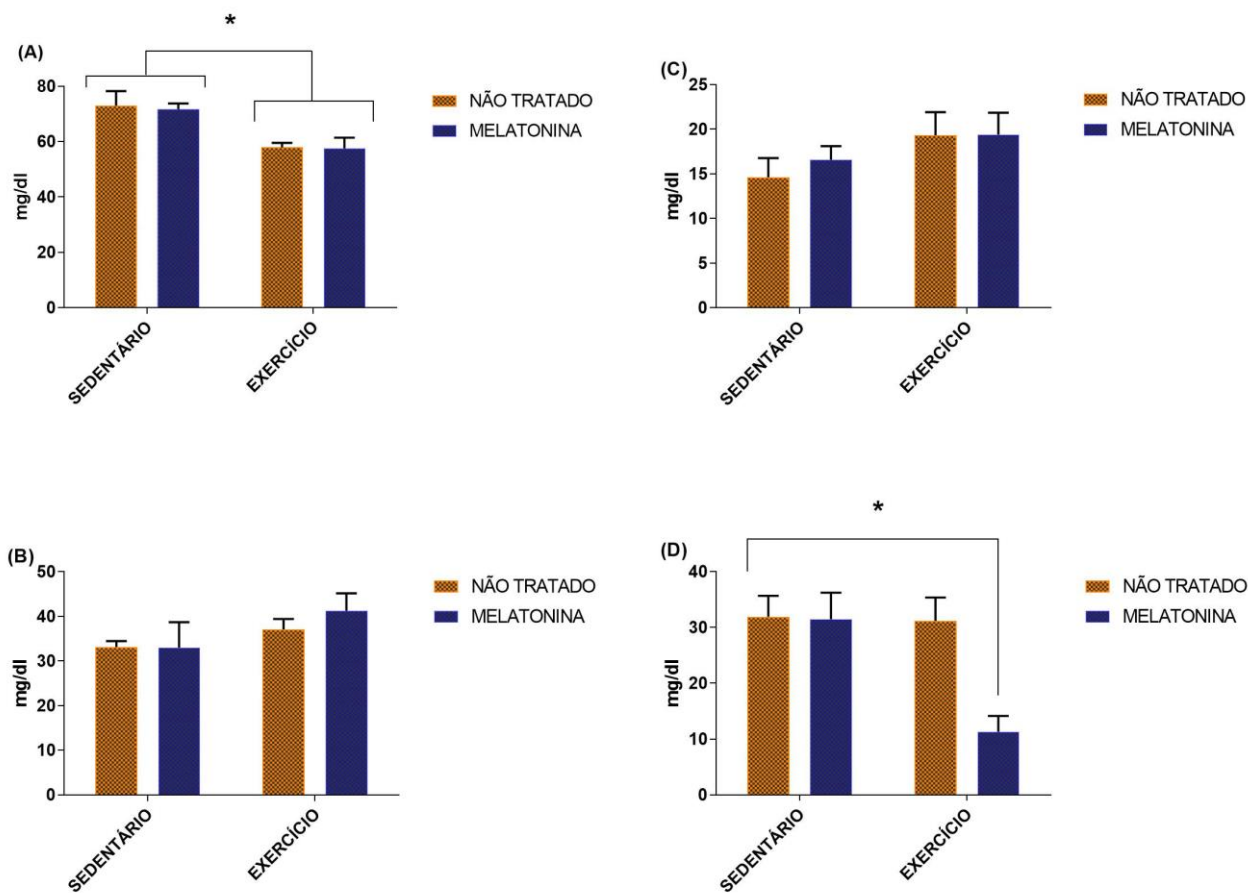
**Figura 13(C)**-Músculo edl úmido em (g) / pelo comprimento da tíbia em (cm). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias (n=14).

**Figura 13(D)**-Tecido adiposo inguinal em (g) / pelo comprimento da tíbia em (cm). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias (n=14).

**Figura 13(E)**-Tecido adiposo periepididimal em (g) / pelo comprimento da tíbia em (cm). # exercício vs sedentários, # sedentário melatonina vs sedentários, ( $p < 0,05$ ), \*exercício melatonina vs sedentários, ( $p < 0,001$ ). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias (n=14).

**Figura 13(F)**-Tecido adiposo retroperitoneal em (g) / pelo comprimento da tíbia em (cm). \*exercício melatonina vs sedentário, ( $p < 0,05$ ). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias (n=14).

O perfil lipídico plasmático foi avaliado após a eutanasia, o treinamento físico associado ou não ao tratamento com melatonina, produziu uma diminuição no conteúdo de colesterol total. Figura 14(A). Não houve diferença entre os grupos em relação ao conteúdo de HDL e triglicerídeos, respectivamente. Figura 14(B e C). A concentração de LDL foi diminuída de forma significativa pelo grupo exercício tratado com melatonina. Figura 14(D).



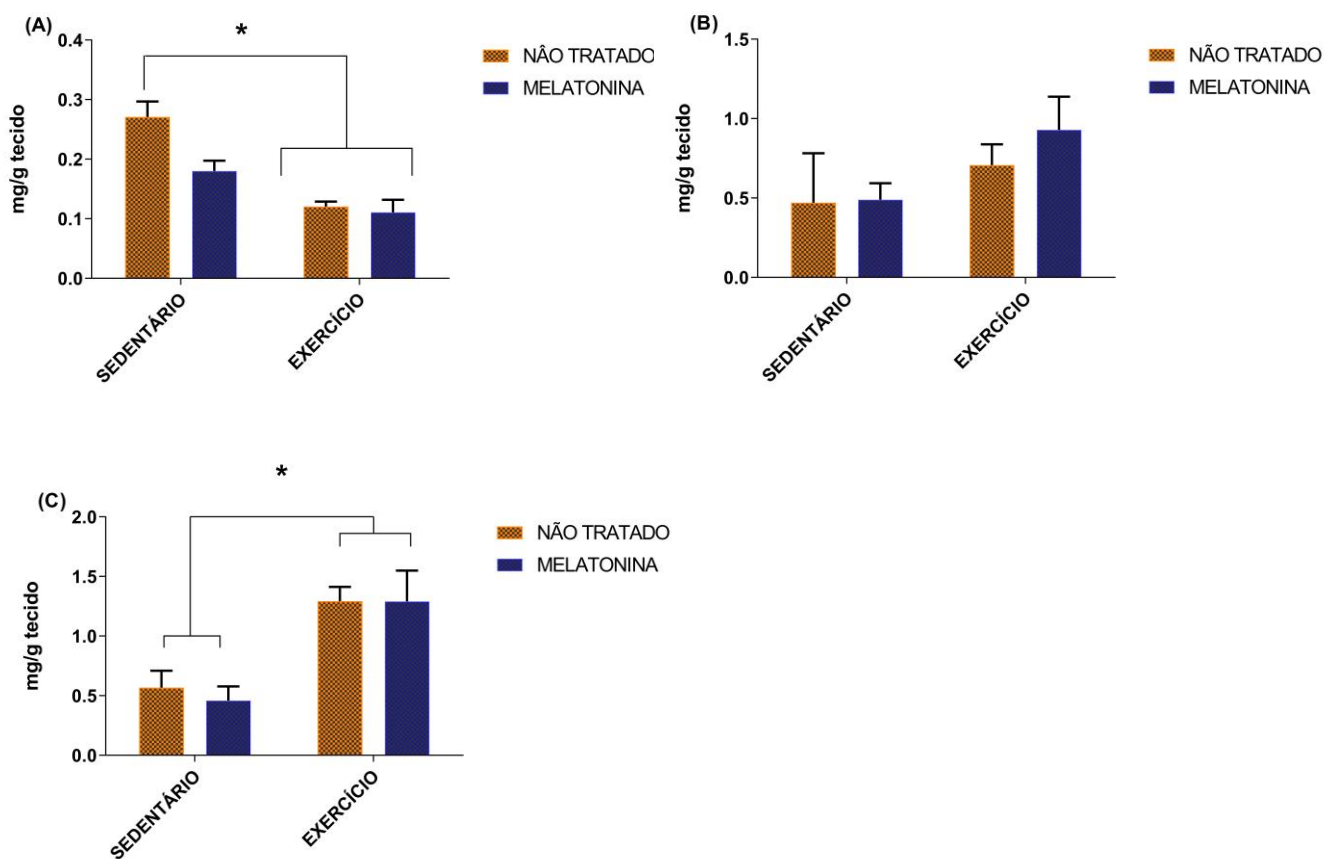
**Figura 14(A)**-Conteúdo de colesterol total em (mg/dl). \* vs sedentários,  $p < 0,05$ . Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 14(B)**- Conteúdo de colesterol HDL em (mg/dl). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 14(C)**- Conteúdo de triglicerídeos em (mg/dl). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 14(D)**-Conteúdo de colesterol LDL em (mg/dl). \* vs sedentários, \* vs exercício  $p < 0,001$ . Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

O conteúdo de glicogênio foi avaliado após o protocolo experimental. Os animais sedentários não tratados, apresentaram maior conteúdo de glicogênio hepático, em relação aos grupos exercitados. Figura 15 (A). Não houve diferença entre os grupos no conteúdo de glicogênio no músculo EDL, embora houvesse tendência de maior quantidade nos grupos exercitados. Figura 15 (B). Os grupos exercitados apresentaram maior conteúdo de glicogênio no músculo sóleo. Figura 15(C).



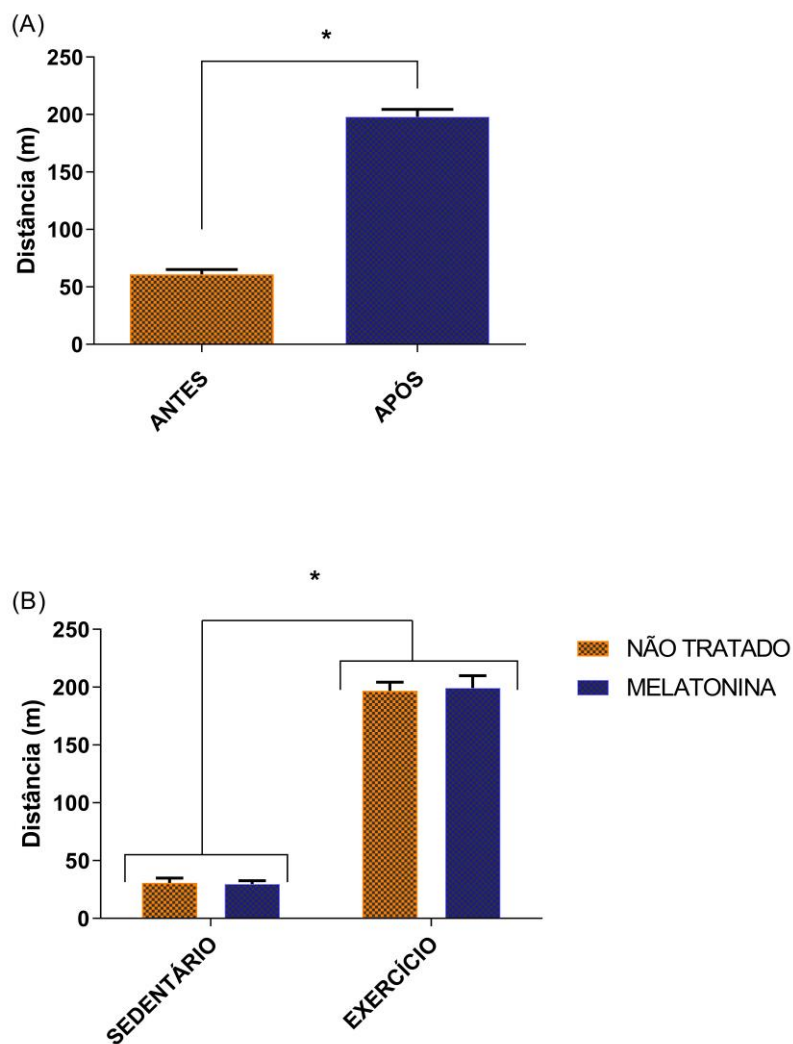
**Figura 15(A)**-Conteúdo de glicogênio hepático em (mg/g). \* vs exercício,  $p < 0,05$ . Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 15(B)**- Conteúdo de glicogênio no músculo EDL em (mg/g). Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

**Figura 15(C)**-Conteúdo de glicogênio no músculo sóleo em (mg/g). \* vs sedentários,  $p < 0,05$ . Os valores são demonstrados como média  $\pm$  erro padrão. Analisado por ANOVA de duas vias ( $n=14$ ).

Os animais que foram submetidos ao treinamento físico passaram por uma semana de adaptação à esteira. Ao final deste período, foi realizado um teste de exaustão escalonado.

A eficácia do protocolo de treinamento foi comprovada mediante a comparação entre o teste inicial e final dos grupos exercitados. Figura 16(A). O treinamento promoveu ganho de capacidade física nos grupos exercitados em comparação ao sedentários, não havendo diferença entre os grupos que receberam tratamento com melatonina. Figura 16(B).

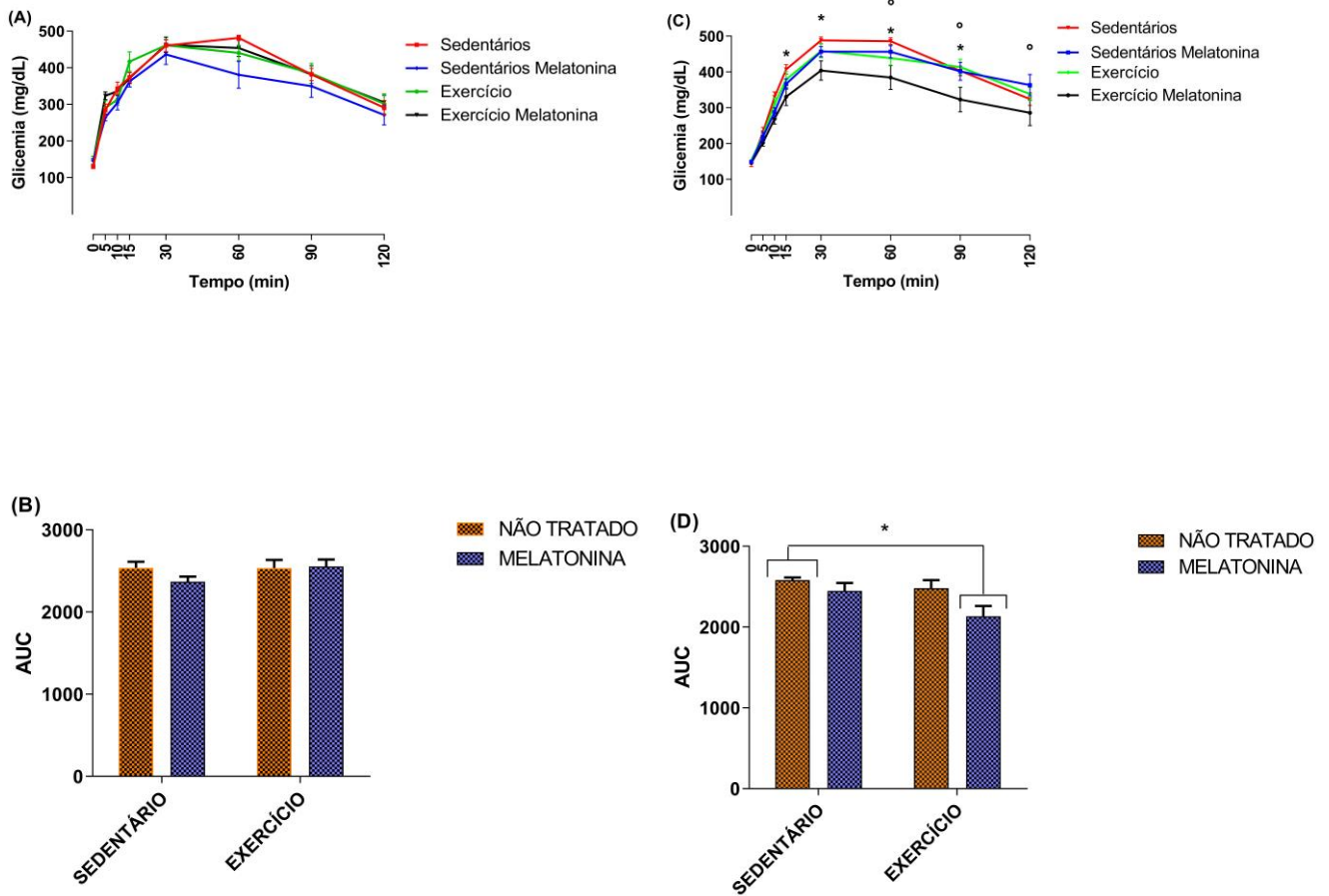


**Figura 16(A)**- Teste de exaustão nos grupos treinados antes e depois do protocolo de exercício. Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado pelo teste T \*  $p < 0.0001$ .  $n = 28$ .

**Figura 16(B)**- Teste de exaustão realizado na 11ª semana do protocolo experimental em todos os grupos. Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. \* vs sedentários.  $n=14$



Os animais foram submetidos a testes de tolerância a glicose (GTT) antes do início do protocolo experimental Figura 17 (A e B). Na 10<sup>o</sup> semana de tratamento, foi realizado um novo teste de GTT, e, os animais do grupo exercício tratado com melatonina apresentaram melhora em relação ao grupo sedentário não tratado. Figura 17 (C e D).



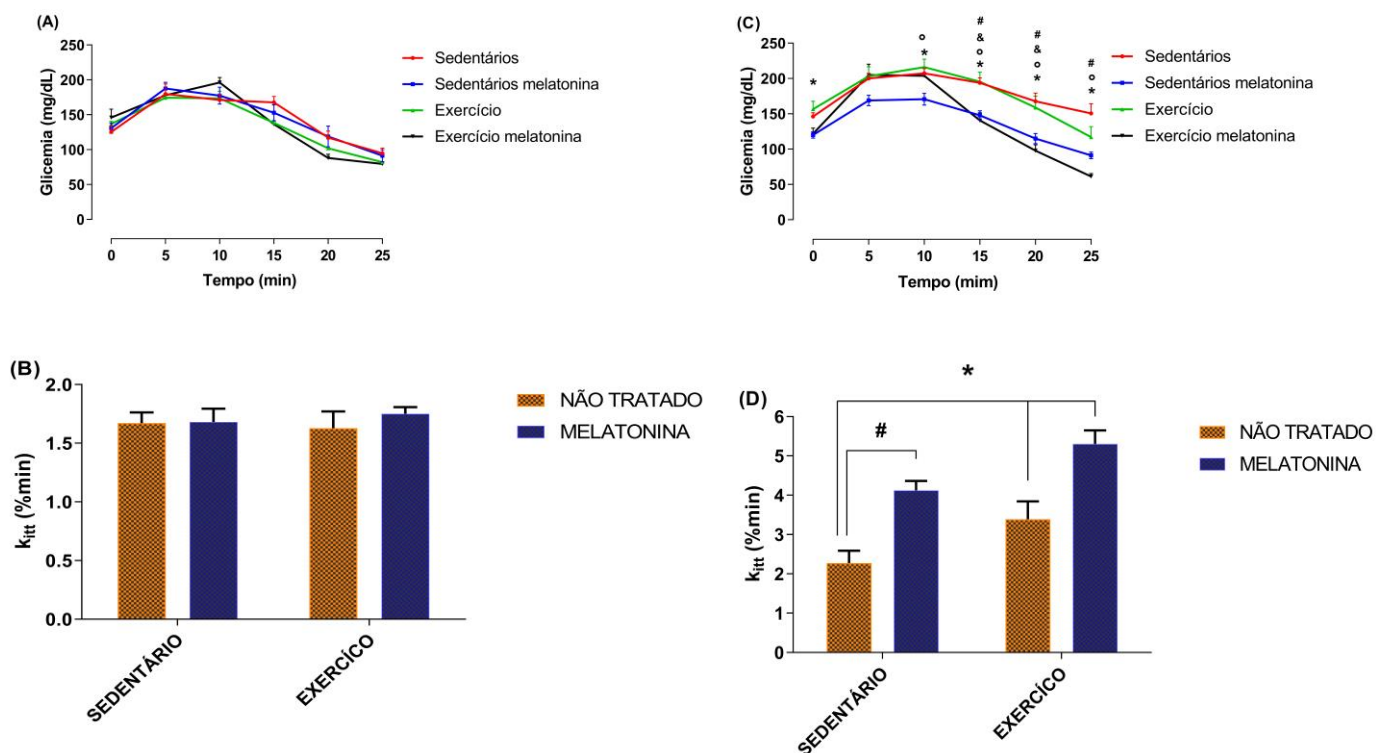
**Figura 17(A)**-Teste de tolerância à Glicose (GTT) antes do protocolo experimental realizado no ZT 14. Valores expressos em mg/dl, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7

**Figura 17(B)**-Área sob a curva do GTT antes do protocolo experimental. Valores são expressos em a área total da AUC, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 17(C)**-Teste de tolerância à Glicose (GTT) 10<sup>o</sup> semana do protocolo experimental realizado no ZT 14. \*exercício melatonina vs sedentários, ° exercício melatonina vs sedentários melatonina. p <0,05. Valores expressos em mg/dl, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 17(D)**-Área sob a curva do GTT 10<sup>o</sup> semana do protocolo experimental. \* exercício melatonina vs sedentário não tratado (p < 0,05). Valores são expressos em área sob a curva (AUC), representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

Os animais foram submetidos a testes de tolerância a insulina (ITT) antes do início do protocolo experimental Figura 18 (A e B). No teste de ITT realizado na 10<sup>o</sup> semana de tratamento, observou-se claramente uma melhor sensibilidade à insulina nos animais que receberam tratamento com melatonina e um efeito aditivo entre o treinamento físico e a suplementação com melatonina. Figura 18 (C e D).



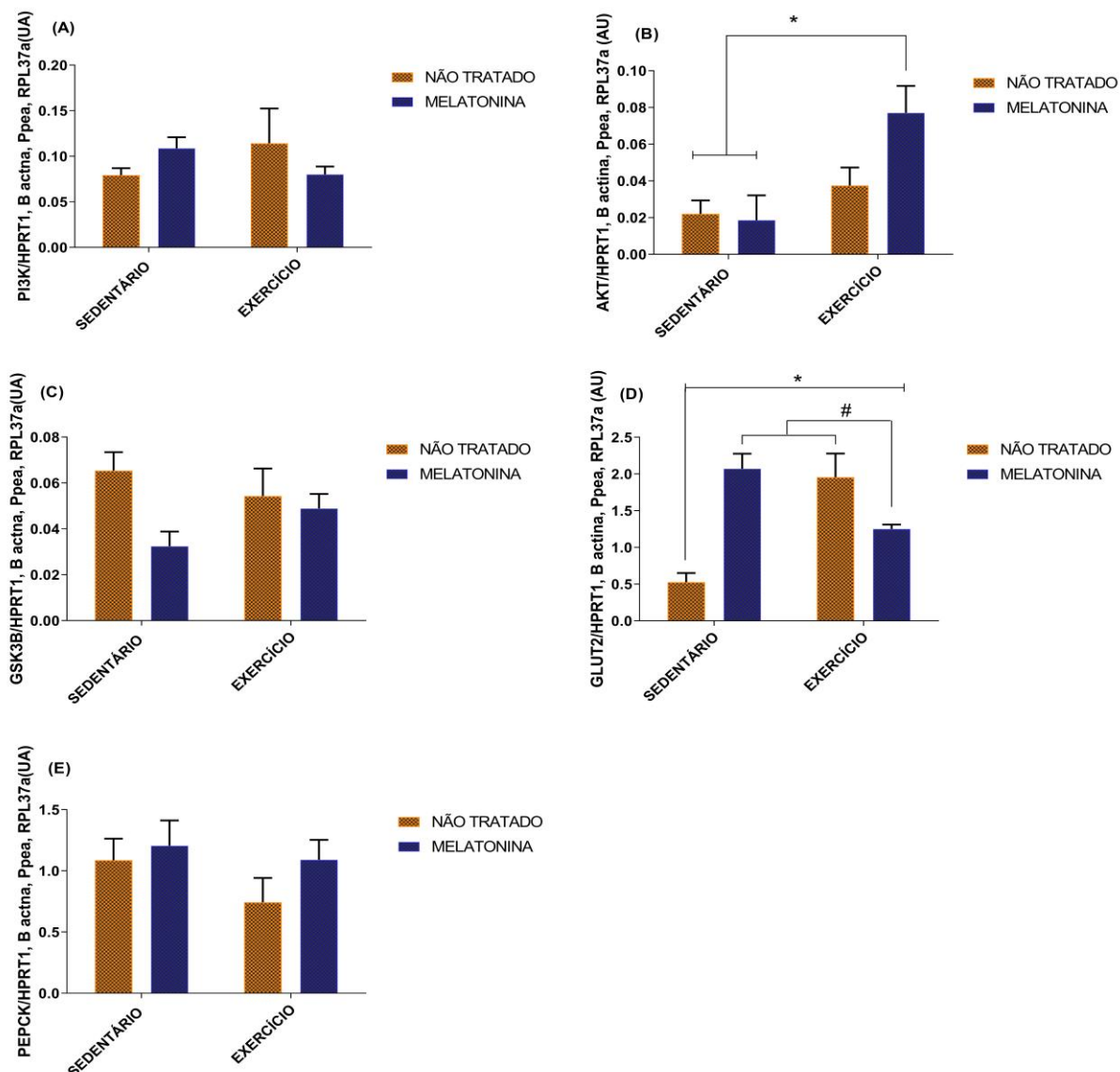
**Figura 18(A)**-Teste de tolerância à Insulina (ITT) antes do protocolo experimental realizado no ZT 14 com 0,5U de insulina por peso corporal. Valores expressos em mg/dl, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 18(B)**-Kitt do teste de tolerância à Insulina (ITT) antes do protocolo experimental realizado no ZT 14 com 0,5U de insulina por peso corporal. Valores expressos em %/min, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 18(C)**-Teste de tolerância à insulina (ITT) 10<sup>o</sup> semana do protocolo experimental realizado no ZT 14 com 0,5U de insulina por peso corporal. \* exercício melatonina vs sedentário, ° sedentário melatonina vs sedentário. (p<0,05). Valores expressos em mg/dl, representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 18(D)**- kITT do teste de tolerância à insulina (ITT) 10<sup>o</sup> semana do protocolo experimental realizado no ZT 14 com 0,5U de insulina por peso corporal. \* exercício melatonina vs exercício não tratado, \* exercício melatonina vs sedentário não tratado, ° sedentário melatonina vs sedentário não tratado. (p<0,05). Valores expressos em (%/min), representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

A expressão gênica foi avaliada no tecido hepático no ZT 14. Houve maior expressão de AKT1, entre o grupo exercício tratado com melatonina, comparado aos animais sedentários. Figura 19 (B). A expressão de Glut 2, foi significativamente menor no grupo sedentário, em relação aos animais tratados com melatonina e exercitados. Figura 19 (D). Não houve diferença na expressão dos genes PI3K e GSK3 $\beta$ . Figura 17 (A e C) respectivamente.



**Figura 19(A)**-Análise da expressão gênica do Pi3K (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

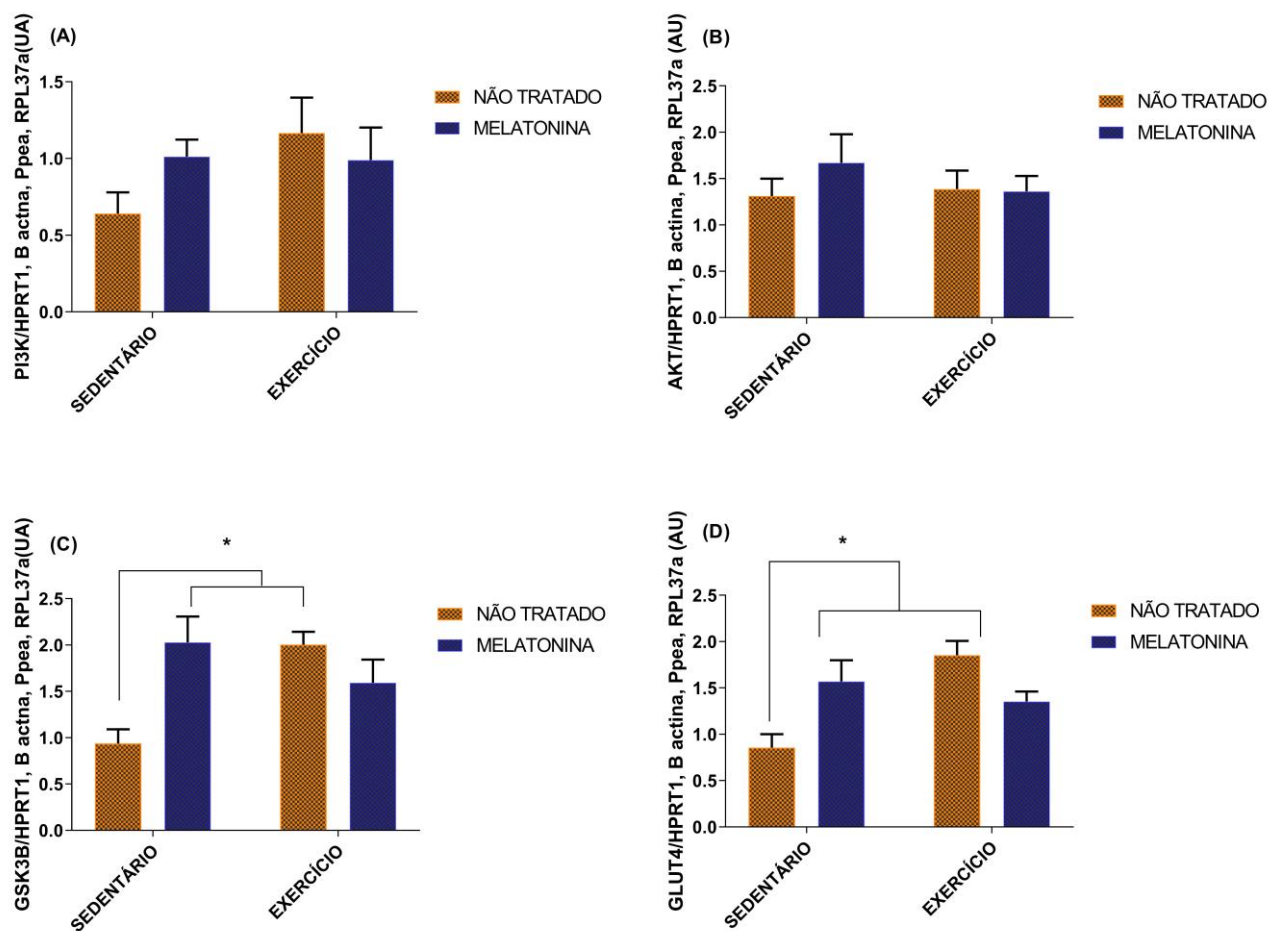
**Figura 19(B)**-Análise da expressão gênica do AKT1 (ZT14). \* vs sedentários ( $p < 0,05$ ). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=6.

**Figura 19(C)**-Análise da expressão gênica do Gsk3 $\beta$  (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 19(D)**-Análise da expressão gênica do Glut-2 (ZT14). \* vs sedentário ( $p < 0,05$ ). # vs exercício melatonina ( $p < 0,05$ ) Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 19(E)**-Análise da expressão gênica do PCK (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

A expressão gênica do músculo sóleo foi avaliada no ZT 14. O gene *GSK3 $\beta$*  foi mais expresso nos grupos sedentário melatonina e exercício não tratado, e, houve uma tendência no grupo exercício melatonina, em comparação aos animais sedentários não tratados. Figura 20 (C). O gene *Glut4*, apresentou o mesmo padrão, maior expressão nos grupos sedentário melatonina e exercício não tratado, e, uma tendência no grupo exercício melatonina, em comparação aos animais sedentários não tratados. Figura 20 (D). Não houve diferença entre os grupos na expressão de *PI3k* e *AKT-1*. Figura 18 (A e B) respectivamente.



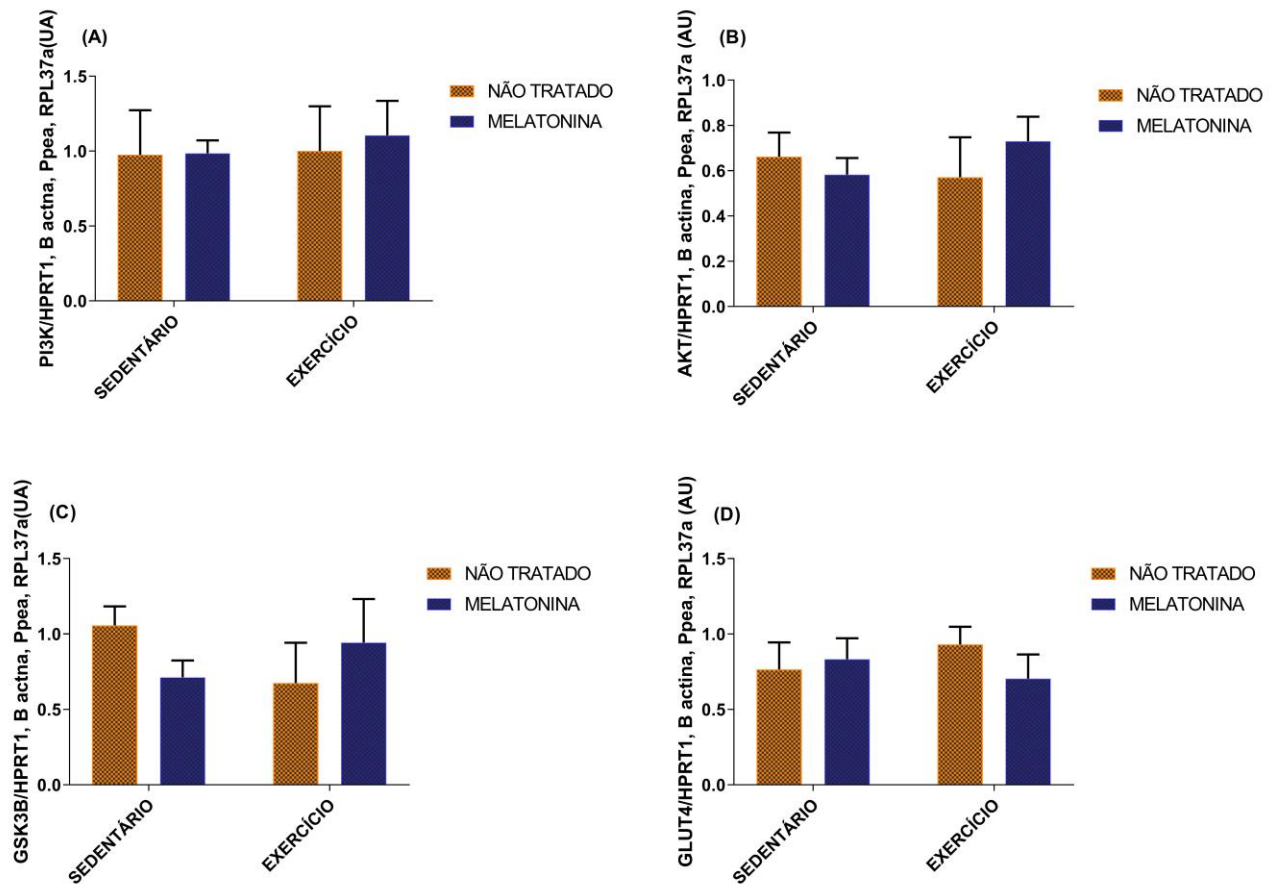
**Figura 20(A)**-Análise da expressão gênica do *Pi3K* (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 20(B)**-Análise da expressão gênica do *AKT-1* (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=6.

**Figura 20(C)**-Análise da expressão gênica do *Gsk3 $\beta$*  (ZT14). \* vs sedentário (p<0,05). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 20(D)**-Análise da expressão gênica do *Glut-4* (ZT14). \* vs sedentário (p<0,05). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

A expressão gênica do músculo EDL foi avaliada no ZT 14. Não houve diferença entre os grupos avaliados, nos genes PI3k, AKT-1, GSK3 $\beta$  e GLUT-4. Figura 21 (A, B, C e D) respectivamente.



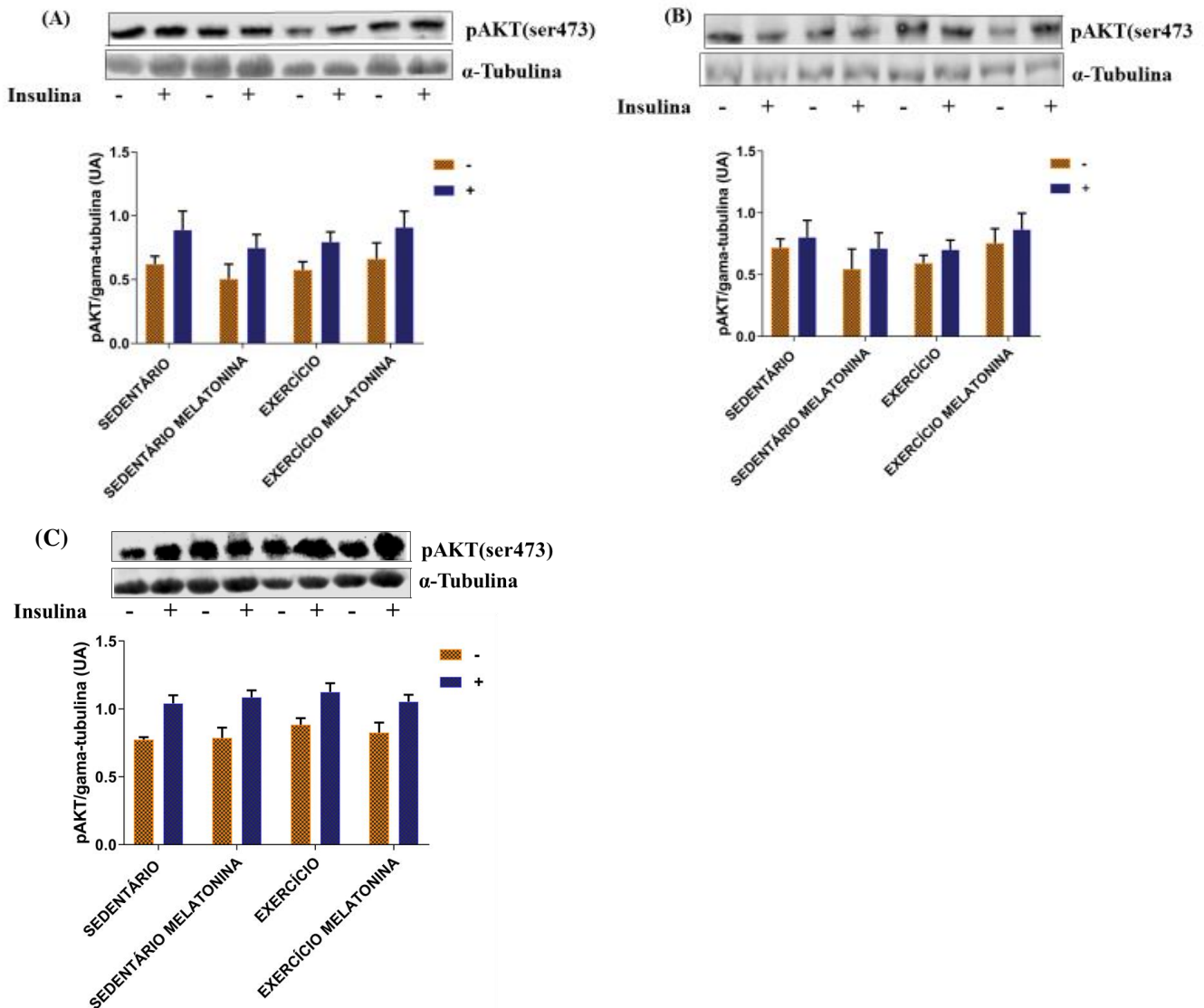
**Figura 21(A)**-Análise da expressão gênica do Pi3K (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 21(B)**-Análise da expressão gênica do AKT-1 (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=6.

**Figura 21(C)**-Análise da expressão gênica do Gsk3 $\beta$  (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6.

**Figura 21(D)**-Análise da expressão gênica do Glut-4 (ZT14). Os valores são mostrados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n= 6

Após a realização do protocolo experimental, foram realizados ensaios para obtenção de tecidos com, e, sem estímulo de insulina, para a quantificação do conteúdo proteico das principais proteínas envolvidas na via da sinalização insulínica no músculo sóleo, músculo EDL e fígado. Figura 22 (A, B e C) respectivamente. De acordo com os resultados, o conteúdo de pAKT não apresentou diferenças entre os grupos estudados.

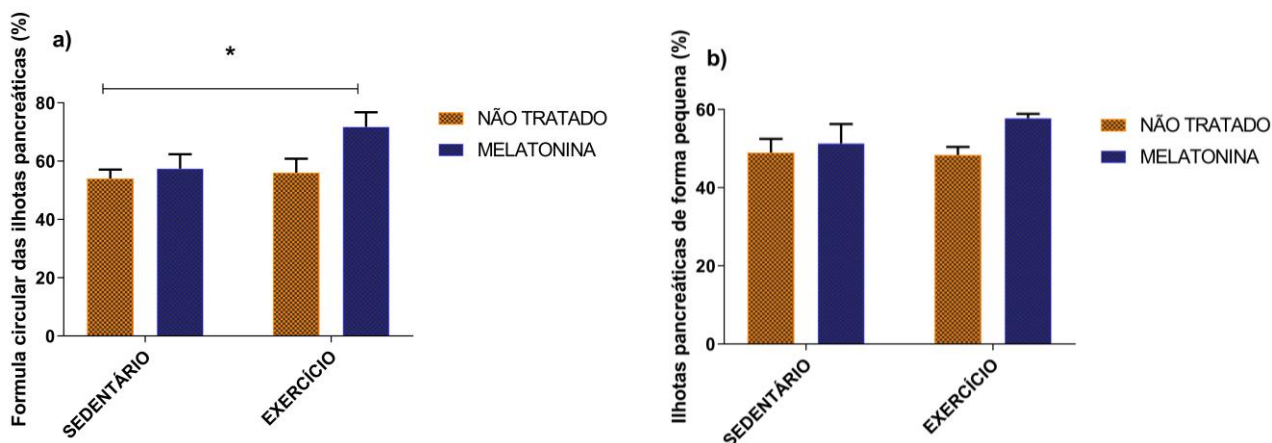


**Figura 22(A)-** Conteúdo proteico de pAKT no músculo sóleo após estímulo com insulina (2U). Valores expressos em unidades arbitrárias(UA) representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 22(B)-** Conteúdo proteico de pAKT no músculo EDL após estímulo com insulina (2U). Valores expressos em unidades arbitrárias(UA) representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

**Figura 22(C)-** Conteúdo proteico de pAKT no fígado após estímulo com insulina (2U). Valores expressos em unidades arbitrárias(UA) representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias. n=7.

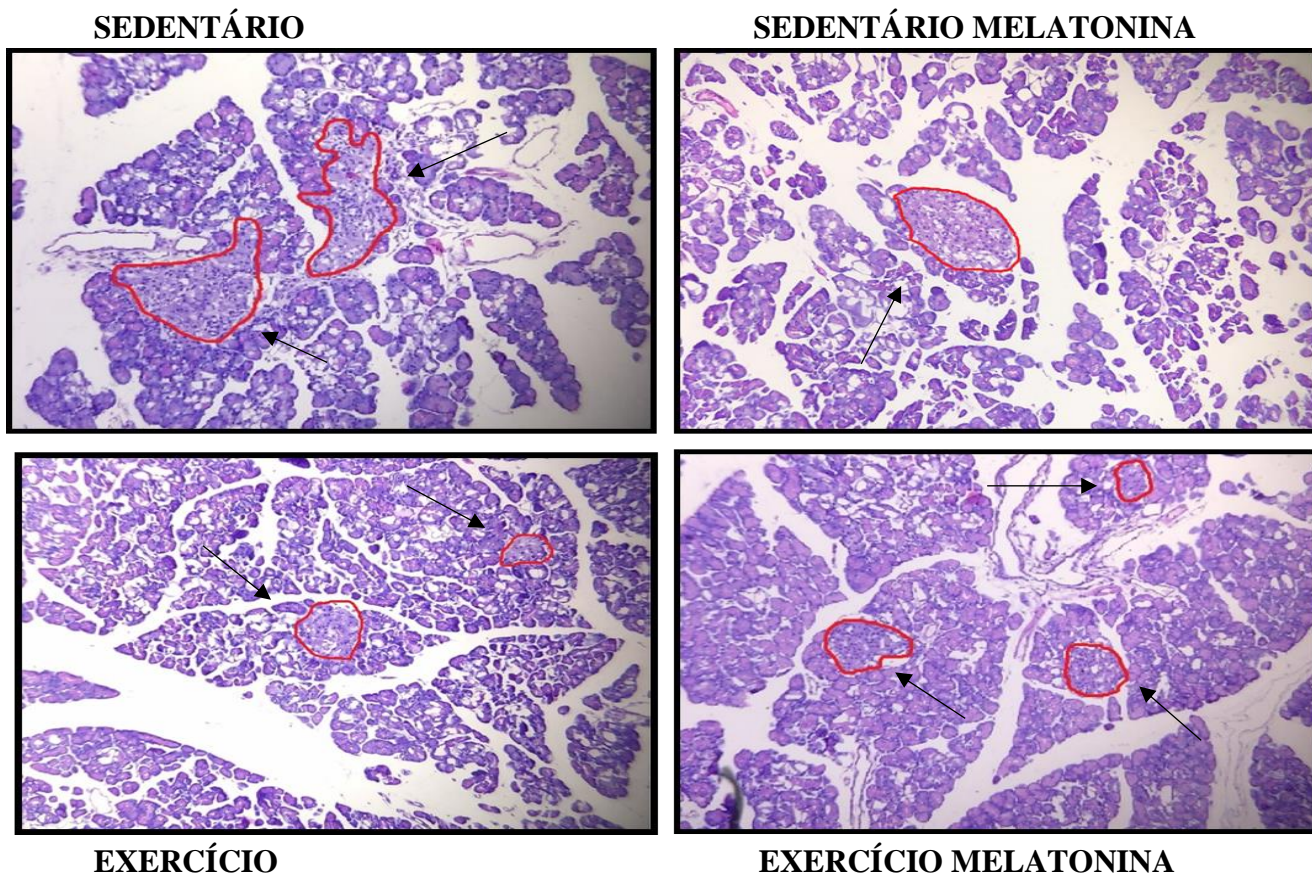
O tecido pancreático foi retirado e preparado para análises morfológicas das ilhotas pancreáticas. Os animais treinados e tratados com melatonina apresentaram maior conteúdo de ilhotas com circularidade normal, indicando um melhor estado funcional. Figura 23 (A). A figura 23(B) representa a medida do tamanho das ilhotas, não havendo diferença entre os grupos. As imagens coradas em técnica de HE, demonstram que os animais sedentários apresentavam ilhotas com formato disforme caracterizando problemas funcionais, o tratamento com melatonina e o treinamento físico melhoraram esse quadro. Figura 23(C). A imunomarcagem para insulina demonstrou claramente uma menor intensidade nos grupos sedentários, relação aos grupos que receberam o tratamento com melatonina e treinamento físico. Houve um efeito combinado entre os dois tratamentos. Figura 23(D)



**Figura 23(A)**- Circularidade das ilhotas expressos em (%). \* vs sedentário ( $p < 0,05$ ). Valores representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias.  $n=7$ .

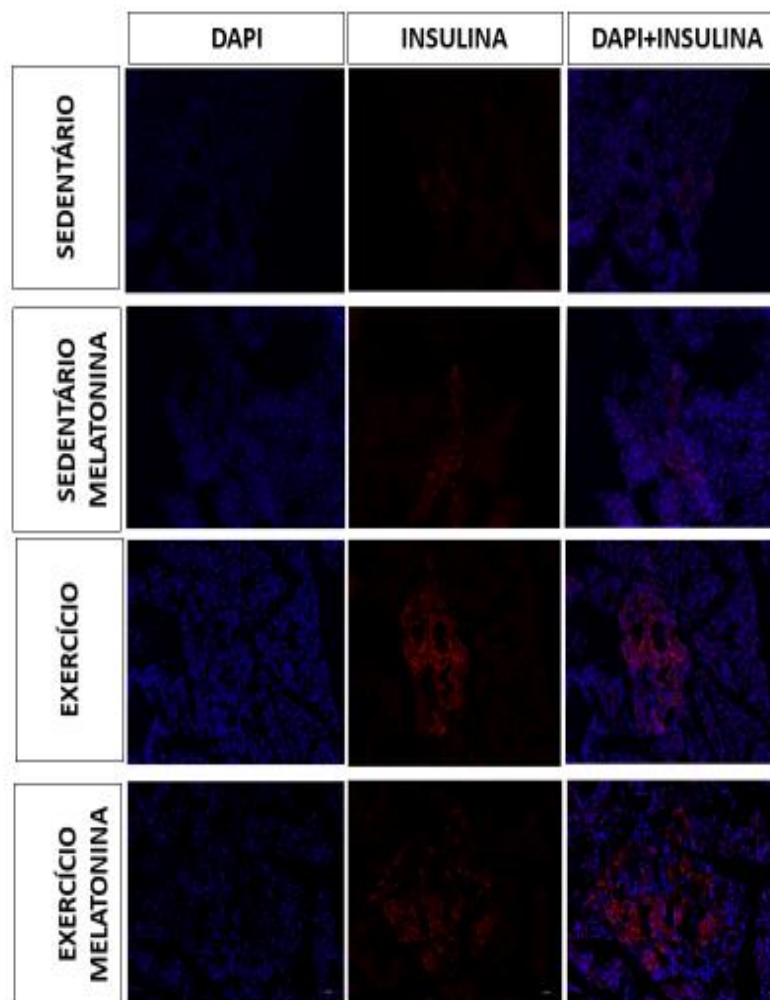
**Figura 23(B)**- Tamanho das ilhotas expressos em (%). Valores representados como média  $\pm$  E.P.M. Analisado por ANOVA de duas vias.  $n=7$ .

FIGURA 23 (C)



**Figura 23 (C)**- Cortes seriados do tecido pancreático (5.0  $\mu\text{m}$  espessura) corados em técnica HE. Imagens representativa em aumento de 100x.



**Figura 23(D)**

**Figura 23 (D)**- Cortes seriados do tecido pancreático (5.0  $\mu\text{m}$  espessura) Imunologicamente marcados para insulina e DAPI. Imagens representativa em aumento de 40x.

## 8 DISCUSSÃO

O presente trabalho procura investigar o papel da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio no metabolismo energético, com ênfase na homeostase glicêmica no diabetes mellitus tipo 2, para tal, utilizamos como modelo experimental ratos Goto Kakizaki.

Os trabalhos de GOTO; KAKIZAKI; MASAKI, 1975, 1976, demonstraram que animais desta linhagem apresentam resistência à insulina e intolerância à glicose a partir da 10<sup>o</sup> semana de vida na ausência de um fenótipo obeso. A obtenção do modelo experimental foi concebida por seleção genética de animais Wistar que apresentavam hiperglicemia de jejum e, em testes de tolerância a glicose. Após o cruzamento desses animais com alterações na homeostase glicídica, foi observado, altos níveis de glicose sérica em alguns indivíduos da prole. O modelo foi estabelecido quando 100% da prole apresentou distúrbios no metabolismo glicídico. Posteriormente, os trabalhos de Galli et al., 1996; Guaguier et al., 1996, demonstraram que animais GK apresentavam mutações em diversos cromossomos, caracterizando que a inabilidade na manutenção do balanço glicêmico desses animais é de origem poligênica.

Os mecanismos pelos os quais esses animais desenvolvem resistência à insulina continuam subjacentes (EHSES et al., 2007). Entretanto, é bem estabelecido na literatura que animais GK apresentam complicações na síntese e secreção de insulina e, menor massa de células beta pancreáticas já em períodos pré-natal (MOVASSAT et al.; 2007; PORTHA et al., 2009).

No início do protocolo experimental os animais foram pesados e distribuídos de forma para que não houvesse variação de peso corporal entre os grupos e, semanalmente os animais foram pesados. A massa corpórea é resultado de um refinado balanço entre a entrada e dispêndio de energia. Neste sentido, em nosso trabalho o treinamento físico produziu um saldo energético negativo refletindo no delta final da massa corpórea, embora o gasto calórico não tenha sido aferido em nosso estudo, os grupos exercitados tiveram menor consumo alimentar corroborando com dados da literatura (FLORES et al, 2006; ROPELLE et al, 2010).

Embora já bem observado em diversos trabalhos que a melatonina possui efeitos no controle do ganho do peso em ratos Wistar (Wolden-Hanson et al, 2000; Rios-Lugo et al, 2015; Buonfiglio et al, 2018), em nosso modelo experimental ela não conseguiu

produzir este efeito, talvez porque, os animais GK apresentem um menor peso corporal absoluto. De acordo com estudos anteriores, os ratos GK apresentaram peso corporal 10 a 20% menor que os ratos Wistar controle (Movassat et al., 2008; Almon et al., 2009).

No entanto, quando analisado a distribuição da massa adiposa, observamos uma evidente diminuição dos coxins adiposos periepididimal e retroperitoneal, tanto nos animais que foram submetidos ao treinamento físico, quanto nos grupos tratados com melatonina. Dados similares foram observados, em animais idosos treinados e suplementados com melatonina (MENDES et al., 2013). Neste contexto, Alonso-Vale et al. (2005) mostraram um papel anti lipogênico da melatonina, por meio da inibição da diferenciação de pré adipócitos em adipócitos, reduzindo, portanto, o número de adipócitos.

Está bem estabelecido que o tecido adiposo branco não está apenas envolvido no armazenamento de energia, mas também, funciona como um órgão endócrino que secreta várias substâncias bioativas, como leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral alfa (TNF) - $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6), proteína quimioatraente resistina, adiponectina, entre outras. A função fisiológica das adipocinas identificadas até o momento, é altamente variada e compreende proteínas com propriedades pró inflamatórias, como as citocinas clássicas - fator de necrose tumoral-a (TNF-a) e interleucina-6 (IL-6), diretamente relacionadas ao quadro de resistência insulínica, e, no sentido contrário, a adiponectina, também conhecida como Acrp-30 (30-kDa adipocyte complement-related protein), apM1 ou adipoQ, agindo como fator protetor ao quadro fisiopatológico do diabetes tipo 2, por aumentar a sensibilidade insulínica (BESSA-LIMA et al., 2006).

Uma correlação entre o grau de obesidade e níveis circulantes de TNF-a e IL-6, já foi bem demonstrada, bem como um aumento na concentração de adiponectina com a redução do tecido adiposo, localizado na cavidade intraperitoneal (RAJALA 2003). Neste sentido, a diminuição da massa adiposa estabelecida pelo nosso protocolo experimental, certamente contribuiu para uma melhor sensibilidade a insulina observada nos ensaios de (ITT). Corroborando com nossos achados, Farias et al., (2019) e Favaro et al., (2015), demonstraram que, a suplementação de melatonina impediu um aumento da expressão de leptina, IL-6 e TNF-a no depósito de periepididimal. Além disso, a melatonina foi eficaz na diminuição dos níveis de leptina e resistina no plasma de animais obesos, melhorando assim a homeostase glicêmica.

Vários trabalhos relataram que animais GK apresentam alterações no perfil lipídico plasmático (ARGOUD et al., 2006; MATAFOME et al., 2009; GIROIX et al., 2011).

A pinealectomia em ratos jovens, e a diminuição da síntese e secreção de melatonina em animais idosos, provocaram um desbalanço no metabolismo lipídico, sendo que a suplementação com melatonina e o exercício físico reverteram essa desordem metabólica (BORGES-SILVA et al., 2006, MENDES et al., 2013). Neste sentido, esperávamos que nosso tratamento com melatonina e exercício físico provocasse alterações no perfil lipídico. Entretanto, em nossos animais isso não foi observado. Embora os animais exercitados, apresentassem um conteúdo menor de colesterol total em relação aos grupos sedentários, ao final do protocolo experimental, nenhum dos grupos apresentou valores fora de um padrão considerado normal. Porém, é preciso considerar, o fato da eutanásia de nossos animais terem ocorrido com apenas 6 horas de restrição alimentar, o que pode ter afetado nossos resultados.

Mazepa et al. (2000) demonstraram que a melatonina exerce um efeito poupador nos estoques de glicogênio, visto que, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular aumentou em animais exercitados tratados com melatonina em comparação com animais sedentários. A pinealectomia reduziu o os estoques de glicogênio no fígado e no músculo esquelético, atenuando a capacidade de realizar exercícios aeróbios (BORGES-SILVA et al., 2007). Mendes et al. (2013) em animais idosos, onde a síntese e secreção de melatonina estão diminuídas, revelou em seus trabalhos que a reposição terapêutica de melatonina se faz necessária para a preservação dos estoques de glicogênio em animais exercitados.

Em conjunto esses trabalhos sustentaram a hipótese que, o treinamento físico e a suplementação com melatonina, aprimorariam o metabolismo do glicogênio em nosso modelo experimental. Os ratos GK, devido ao quadro de resistência à insulina, apresentam menor concentração de glicogênio no músculo estriado do que os controles Wistar (VILLAR-PALASI, FARESE 1994, SOARES et al., 2019). Em nosso trabalho os resultados obtidos em relação ao conteúdo de glicogênio causaram surpresa pela ambiguidade. Os estoques de glicogênio hepático estavam mais elevados nos animais sedentários não tratados com melatonina, em comparação aos dos grupos exercitados, e, no músculo sóleo, o treinamento físico aumentou os estoques de glicogênio em comparação com animais sedentários, com a melatonina não produzindo nenhum efeito em ambos os tecidos. A melatonina exerce uma função cronobiótica, distribuindo a

informação do relógio central, localizado no núcleo supraquiasmático hipotalâmico, para os relógios periféricos (CIPOLLA NETO; AFECHE, 1999; CIPOLLA-NETO, AMARAL, 2018). No entanto, outras pistas ambientais ou Zeitgebers, podem exercer um sinal mais relevante para alguns tecidos específicos, como alimentação para o fígado e exercício físicos para o músculo esquelético (EZAGOURI et al, 2019). Desta forma, recentes trabalhos que procuraram investigar o impacto da hora de execução do exercício, no metabolismo energético produziram resultados semelhantes aos nossos achados, quando o exercício era executado no ZT 14 (EZAGOURI et al., 2019, SATO et al., 2019)

Com relação aos ensaios que desafiavam a tolerância à glicose e, tolerância à insulina, embora nossos resultados apresentassem melhora nos grupos que receberam suplementação com melatonina (ITT) e um efeito combinado entre os tratamentos com exercício e melatonina (ITT e GTT), o sinal entre insulina e AKT não apresentou diferença entre os grupos estudados. No entanto, encontramos algumas dificuldades experimentais, não havendo diferença estatística, embora houvesse uma tendência, nos níveis de fosforilação entre os tecidos basais e estimulado com hormônio. Uma possível explicação para falha no ensaio é a hiperglicemia causada pelo anestésico.

Outros estudos que utilizaram o mesmo modelo, também tiveram dificuldade em demonstrar maior conteúdo de pAKT em testes de via estimulada. Os trabalhos Kuwabara et al., 2017 demonstraram que após estímulo com insulina o tecido hepático e muscular não apresentavam menor conteúdo de pAKT em serina 473 em relação à animais controle Wistar. Nesse sentido, dados do nosso grupo, ainda não publicados, que tem por objetivo caracterizar os efeitos da melatonina na via de sinalização insulínica de forma circadiana em ratos GK, obtiveram resultados semelhantes no musculo sóleo e tecido adiposo, com exceção ao tecido hepático que apresentou maior conteúdo de pAKT, demonstrando um efeito positivo da melatonina, entretanto essa melhora se mostrou ser ZT dependente.

Após nos depararmos com resultados observados até o momento, foi pensado sobre a possibilidade do nosso tratamento ter produzido uma melhora no pâncreas endócrino desses animais. Como já relatado anteriormente, os ratos GK apresentam desenvolvimento anormal do tecido pancreático frente ao quadro esperado de resistência à insulina.

Desta forma, nos propusemos investigar o estado funcional das células beta desses animais, e, surpreendentemente a quantidade de ilhotas pancreáticas coletadas em nossos ensaios não foram suficientes para a quantificação de espécies reativas de oxigênio, e secreção de insulina em diferentes concentrações de glicose. Sendo assim, a solução

encontrada foi analisar a estrutura das ilhotas pancreáticas. A manutenção da arquitetura das ilhotas e o número de células  $\beta$  são importantes para a preservação da estrutura pancreática intacta e funcionamento adequado do órgão (JESSEN; GOODYEAR, 2005).

Nossos resultados apontaram que ambos os tratamentos apresentaram um efeito protetor ao tecido pancreático. As análises de H&E demonstraram que a melatonina e o treinamento físico preservaram a estrutura circular das ilhotas pancreáticas, caracterizando um bom estado funcional, em relação aos animais sedentários, que apresentavam ilhotas com formato disforme. Os resultados da imunofluorescência com marcação para insulina apontaram uma maior concentração nos grupos que receberam tratamento e, ainda mais impressionante, houve um efeito protetor combinado entre o exercício físico e a melatonina. No entanto, é importante ressaltar, que as marcações com glucagon e somatostatina não foram realizadas em nossos estudos, gerando um fator limitante para um melhor entendimento do estado estrutural das ilhotas.

As espécies reativas de oxigênio (EROS) ativam um sinal pró-apoptótico que induzem a morte de células  $\beta$ . Além disso, o estresse oxidativo ativa o eixo NF- $\kappa$ B que através da produção de citocinas inflamatórias sustentam o sinal de morte celular via apoptose (JAIN et al., 2015; TECULA et al., 2018).

Considerando que as ilhotas pancreáticas possuem uma concentração diminuta de enzimas antioxidantes (Lenzen; Drinkgern; Tiedge, 1996; Lenzen, 2008) e, a melatonina possui ações diretas sobre espécies reativas de oxigênio e, também aumenta a expressão de enzimas antioxidantes Reiter et al.(2008), é racional concluir que o tratamento com melatonina tenha produzido o efeito observado em nossos resultados.

Neste sentido, em consonância com nossos achados, Ahmad et al. (2018), observaram que, ratos diabéticos apresentavam aumento significativo na peroxidação lipídica, mas o peso pancreático, sistema antioxidante (GSH, SOD e CAT) apresentavam uma diminuição. O tratamento com melatonina nestes animais restaurou a alteração nos marcadores fisiológicos e bioquímicos. As análises histopatológicas do pâncreas dos animais diabéticos, mostrou danos nas ilhotas de Langerhans, enquanto os ratos tratados com melatonina recuperaram a arquitetura celular e, normalizaram a função do pâncreas. O trabalho de Park et al. (2014) relatou que, o tratamento com melatonina atenuou marcadamente a apoptose celular, eliminando espécies reativas de oxigênio, independente da atividade de enzimas antioxidantes.

Além disso, a melatonina pode estimular a neogênese no pâncreas de ratos diabéticos. Os dados de Simsek et al.(2012) indicaram que essa indolamina promoveu a

inativação da caspase-3 via ativação de Bcl-xL, promovendo a proliferação de células beta, e, a formação de novas pequenas ilhotas, que se originaram de células associadas ao epitélio ductal e de células centroacinares.

Vários estudos sugerem que o exercício físico possui efeito positivo na proliferação celular e proteção das células betas. O treinamento aeróbio moderado é capaz de aumentar mediadores endógenos com papel antioxidantes e anti-inflamatório (COSKUN et al., 2004), (HUANG et al., 2011), (JAIN et al., 2015), (OHAROMARI, DE MORAES, NAVARRO, 2017), (PAULA et al., 2015), (PAULA et al., 2018).

Nossos achados, corroboram com um recente trabalho, que demonstrou, que, o exercício físico promove uma melhora no sistema antioxidante do pâncreas, em animais GK, protegendo o tecido pancreático. Os resultados sugerem um desencadeamento da resposta antioxidante no pâncreas de ratos GK após o treinamento físico, que é suportado pela diminuição da translocação de NF- $\kappa$ B ao núcleo, aumento da expressão dos receptores Glut - 2 e aumento da fosforilação da glicose pela atividade enzimática da hexoquinase (glucocinase). Além do que, houve o aumento da expressão do HO - 1 pancreático, um marcador antioxidante, após o treinamento físico. (RASA et al., 2016).

Durante e após exercício, em resposta a contração muscular, alguns metabolitos e sinais endócrínicos são aumentados na circulação (NARENDRAN et al., 2015). Entretanto, os mecanismos moleculares exatos continuam não conhecidos, e, várias miocinas são candidatas ao cargo de fator exercício protetor. Neste sentido a IL-6 e irisina vem sendo muito postuladas, no entanto, a literatura atual traz a luz trabalhos controversos e ambíguos, mostrando que, esses processos podem envolver outros fatores como ativação da AMPK e mTOR (QU; LIU; HUANG, 2014), (LINNEMANN et al., 2017), (NATALICCHIO et al., 2017).

## 9 CONCLUSÃO

Nossos resultados apontaram que o tratamento com melatonina e o treinamento físico produziram uma melhora no quadro fisiopatológico do diabetes DM2 em ratos Goto Kakizaki. O tratamento melhorou o metabolismo da glicose como demonstrado em testes de GTT e ITT. A morfologia da ilhota pancreática foi preservada nos animais que receberam os tratamentos, além do que, houve um efeito combinado entre os dois tratamentos. Entretanto, fazem-se necessários estudos posteriores para aperfeiçoar o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na modulação do tecido pancreático provocados pelo treinamento físico e a suplementação com melatonina, pensando em novos avanços terapêuticos para o tratamento do diabetes mellitus tipo 2.



## 12 REFERÊNCIAS

AFEICHE, S.C.; AMARAL, F.G.; VILLELA, D.C.M.; ABRAHÃO, M.V.; PERES, R.; CIPOLLA-NETO, J. Melatonin and the pineal gland. In: ROMANO, E.; De LUCA, S. New research on neurosecretory systems. **New York: Nova Science Publishers, Inc.**, p. 151-177, 2008.

ALESSI, D. R.; DOWNES, C. P. The role of PI 3-Kinase in insulin action. **Biochim Biophys Acta**, v. 1436, n. 1-2, p. 151-164, 1998.

ALMON, RR, DUBOIS, DC, LAI, W., XUE, B., NIE, J. E JUSKO, WJ. Análise da expressão gênica de papéis hepáticos na causa e desenvolvimento de diabetes em ratos Goto-Kakizaki. **J. Endocrinol.** 200, 331-346. doi: 10.1677 / JOE-08-0404.2009.

ALONSO M, COLLADO PS, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Melatonin inhibits the expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B activation in rat skeletal muscle. **J Pineal Res.**41(1):8-14.2006.

ALONSO-VALE M, ANDREOTTI S, PERES SB, ANHÊ GF, DAS NEVES BORGES-SILVA C, NETO JC, LIMA FB. Melatonin enhances leptin expression by rat adipocytes in the presence of insulin. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**288(4):E805-12.2005.

ANHÊ, G.F.; CAPERUTO, L.C.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; SOUZA, L.C.; HIRATA, A.E.; VELLOSO, L.A.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C.R. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **J. Neurochem.**, v. 90, n. 3, p. 559-566, 2004.

AMARAL FGD, TURATI AO, BARONE M, SCIALFA JH, DO CARMO BUONFIGLIO D, PERES R, PELICIARI-GARCIA RA, AFEICHE SC, LIMA L, BORDIN S, REITER RJ, MENNA-BARRETO L, CIPOLLA-NETO J. Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia. **J. Pineal Res.**, v.57, p. 67–79. 2014.

AMARAL FGD, ANDRADE-SILVA J, KUWABARA WMT, CIPOLLA-NETO. J New insights into the function of melatonin and its role in metabolic disturbances. **Expert Rev Endocrinol Metab.**14(4):293-300. doi: 10.1080/17446651.2019.1631158.2019.

ANHÊ, G.F.; CAPERUTO, L.C.; PEREIRA-DA-SILVA, M.; SOUZA, L.C.; HIRATA, A.E.; VELLOSO, L.A.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C.R. In vivo activation of insulin receptor tyrosine kinase by melatonin in the rat hypothalamus. **J. Neurochem.**, v. 90, n. 3, p. 559-566, 2004.

ANOTHASINTAWEE, T.; LERTRATTANANON, D.; THAMAKAISON, S.; KNUTSON, K. L.; THAKKINSTIAN, A.; REUTRAKUL, S. Later chronotype is associated with higher hemoglobin A1c in prediabetes patients. **Chronobiol Int.**, v.34, p.393–402, 2017.

ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 186-190, 1994.

ARENDRT, J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. London: **Chapman & Hill**, 1995.

ARGOUD K, WILDER SP, MCATEER MA. Genetic control of plasma lipid levels in a cross derived from normoglycaemic Brown Norway and spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. **Diabetologia** 49:2679–2688.2006.

AVRUCH, J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. **Mol. Cell Biochem.**, v.182, p.31–48, 1998.

BACKER, J. M.; MYERS, M. G. JR.; SHOELSON, S. E.; CHIN, D. J.; SUN, X. J.; MIRALPEIX, M.; HU, P.; MARGOLIS, B.; SKOLNIK, E. Y.; SCHLESSINGER, J. et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. **The Embo Journal**.v.11, n.9, p.3469-3479, 1992.

BARMA P, et al. Lipid induced overexpression of NF-kB in skeletal muscle cells in linked to insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**; 1792:190-200. 2009.

BARNES BR, ZIERATH JR. Role of AMP-activated protein kinase in the control of glucose homeostasis. **Curr Mol Med** 2005;5:341-8.

BESSA LIMA; MIRIAM H. FONSECA-ALANIZ; JULIE TAKADA; MARIA ISABEL C. ALONSO-VALE. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metab**.vol.50 no.doi.org/10.1590/S0004-27302006000200008. 2006

BEI B.ZHANG, GAOCHAO ZHOU, CAILI. AMPK: An Emerging Drug Target for Diabetes and the Metabolic Syndrome. Volume 9, Issue 5, Pages 407-4166 May 2009.

BOGAN JS. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. **Annu Rev Biochem.** v,81, p.507–532, 2012.

BORGES-SILVA, C.N.; ALONSO-VALE, M.I.; FRANZÓI-DE-MORAES, S.M.; TAKADA, J.; PERES, S.B.; ANDREOTTI, S.; SKORUPA, A.L.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T.C.; LIMA, F.B. Pinealectomy impairs adipose tissue adaptability to exercise in rats. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 178-84, 2005a.

BORGES-SILVA, C.N.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ALONSO-VALE, M.I.; TAKADA, J.; ANDREOTTI, S.; PERES, S.B.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T.C.; LIMA, F.B. Reduced lipolysis and increased lipogenesis in adipose tissue from pinealectomized rats adapted to training. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 2, p. 178-84, 2005b.

BORGES-SILVA, C.N.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; PERES, S.B.; FONSECA-ALANIZ, M.H.; ANDREOTTI, S.; CIPOLLA-NETO, J.; PITHON-CURI, T.C.; LIMA, F.B. Pinealectomy reduces hepatic and muscular glycogen content and attenuates aerobic power adaptability in trained rats. **J. Pineal Res.**, v. 43, n. 1, p. 96-103, 2007.

BOURA-HALFON S, ZICK Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**296(4):E581-91. doi: 10.1152/ajpendo.90437.2009.

BROOKS, G. A. The lactate shuttle during exercise and recovery. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v. 18, p. 360-368, 1986.

BUONFIGLIO D, PARTHIMOS R, DANTAS R, CERQUEIRA SILVA R, GOMES G, ANDRADE-SILVA J, RAMOS-LOBO A, AMARAL FG, MATOS R, SINÉSIO J JR, MOTTA-TEIXEIRA LC, DONATO J JR, REITER RJ, CIPOLLA-NETO J. Melatonin Absence Leads to Long-Term Leptin Resistance and Overweight in Rats. **Front Endocrinol (Lausanne)**.9:122. doi: 10.3389/fendo.2018.00122. eCollection. 2018.

BURKHARDT S, TAN DX, MANCHESTER LC, HARDELAND R, REITER RJ. Detection and quantification of the antioxidant melatonin in Montmorency and Balaton tart cherries (*Prunus cerasus*). **J. Agric. Food Chem.** 49, 10, 4898-4902.2001.

BUXTON OM, FRANK SA, L'HERMITE-BALÉRIAUX M, LEPROULT R, TUREK FW, VAN CAUTER E. Roles of intensity and duration of nocturnal exercise in causing phase delays of human circadian rhythms. **Am J Physiol.**273(3 Pt 1):E536-42.1997.

CARDINELI D.P, VACAS M.I. Cellular and molecular mechanisms controlling melatonin release by mammalian pineal glands. **Cell Mol Neurobiol**;7(4):323-37.1987.

CARVALHO, C. R. O. et al. Effect of aging on insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of rats. **Endocrinology**.v. 137, n. 1, p. 151-159, 1996.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. The Role of the Retrochiasmatic Area in the Control of Pineal Metabolism **Neuroendocrinology** ;69:97-1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula Pineal. In: **AIRES, M.M (Ed.) Fisiologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 981-990.

CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFECHE, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J. Pineal Res.**, v. 56, p. 371–381, 2014.

CHAUVEAU A, KAUFAMANN M. Expériences pour la détermination du coefficient de l'activité nutritive et respiratoire des muscles en repos et en travail. **C R Hebd Seances Acad Sci**;104(1):1126-32.1987.

COLLIN, J.P. Differentiation and regression of the cells of the sensory line in the epiphysis cerebri. In: WOLSTENHOLME, G.E.W.; KNIGHT, J. The Pineal Gland. London: **J. A. Churchill**. p. 79–125.1971.

COSTES, S.; BOSS, M.; THOMAS, A. P.; MATVEYENKO, A. V. Activation of melatonin signaling promotes  $\beta$ -cell survival and function. **Mol Endocrinol.**, v.29, p.682–692, 2015.

COSKUN O, OCAKCI A, BAYRAKTAROGLU T, KANTER M. Exercise training prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. **Tohoku J Exp Med.**203(3):145-54.2004.

DA LUZ G, FREDERICO MJ, DA SILVA S, VITTO MF, CESCINETTO PA, DE PINHO RA, PAULI JR, SILVA AS, CINTRA DE, ROPELLE ER, DE SOUZA CTd. Endurance exercise training ameliorates insulin resistance and reticulum stress in adipose and hepatic tissue in obese rats. **Eur J Appl Physiol.**111(9):2015-23. doi: 10.1007/s00421-010-1802-2. 2011.

DANDONA P, ALJADA A, BANDYOPADHYAY A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends immunology;**25(1):4-7.2004.

DEFRONZO RA, TRIPATHY D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care** 2009;32(2):157-163.2009.

DEMIDOVA TIU, AMETOV AS, TITOVA OI. Metabolic and hemodynamic effects of pioglitazone in obese patients with type 2 diabetes. **Klin Med (Mosk).**84(10):44-8.2006.

EHSES JA, PERREN A, EPPLER E, RIBAUX P, POSPISILIK JA, MAOR-CAHN R, GUERPEL X, ELLINGSGAARD H, SCHNEIDER MK, BIOLLAZ G, FONTANA A, REINECKE M, HOMO-DELARCHE F, DONATH M. Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes.** 56(9):2356-70. 2007.

EKNOYAN G. A history of diabetes mellitus -- a disease of the kidneys that became a kidney disease. **J Nephrol;**19 Suppl 10:S71-4.2006.

ELCHEBLY, M. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science.** 283, 1544-8. 1999.

EZAGOURI S, ZWIGHAFT Z, SOBEL J, BAILLIEUL S, DOUTRELEAU S, LADEUIX B, GOLIK M1, VERGES S, ASHER G. Physiological and Molecular Dissection of Daily Variance in Exercise Capacity. **Cell Metab.** 2;30(1):78-91.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.012.2019..

FARIAS TDSM, PAIXAO RID, CRUZ MM, DE SA RDCDC, SIMÃO JJ, ANTRACO VJ, ALONSO-VALE MIC. Melatonin Supplementation Attenuates the Pro-Inflammatory Adipokines Expression in Visceral Fat from Obese Mice Induced by A High-Fat Diet. **Cells.**;8(9). pii: E1041. doi: 10.3390/cells8091041.2019.

FAVERO, G.; STACCHIOTTI, A.; CASTREZZATI, S.; BONOMINI, F.; ALBANESE, M.; REZZANI, R.; RODELLA, L.F. Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese ( ob/ob ) mice. **Nutr. Res.** 35, 891–900.2015.

FLORES MB, FERNANDES MF, ROPELLE ER, FARIA MC, UENO M, VELLOSO LA, SAAD MJ, CARVALHEIRA JB. Exercise improves insulin and leptin sensitivity in hypothalamus of Wistar rats. **Diabetes.** Sep; 55(9):2.554-61.2006.

FORRESTEL AC, MIEDLICH SU , YURCHESHEN M , WITTLIN SD , SELIX MT. Chronomedicine and type 2 diabetes: shining some light on melatonin. *Diabetologia*; 60 (5): 808-822. doi: 10.1007 / s00125-016-4175.2017.

FRAME, S.; COHEN, P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.*, v.359, p.1–16, 2001.

FRAYN, K. N. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. v.45, ed.9, p.1201–10, 2002.

FRESE, T; BACH, A. G; MÜHLBAUER, E; PÖNICKE, K; BRÖMME, H. J; WELP, A; PESCHKE, E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto–Kakizaki rats. *Life Sciences* v. 85, p. 526–533, 2009.

FRESE, T; BACH, A. G; MÜHLBAUER, E; PÖNICKE, K; BRÖMME, H. J; WELP, A; PESCHKE, E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto–Kakizaki rats. *Life Sciences* v. 85, p. 526–533, 2009.

GALLI J, LI LS, GLASER A, OSTENSON CG, JIAO H, FAKHRAI-RAD H, JACOB HJ, LANDER ES, LUTHMAN H. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet*.12(1):31-7.1996.

GARCIA, R.A.P.; AFECHÉ, S.C.; SCIALFA, J.H.; AMARAL, F.G.; SANTOS, S.H.J.; LIMA, F.B.; YOUNG, M.E.; CIPOLLA-NETO, J. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. *Life Sci.*, v. 82, p.108-114, 2008.

GARDNER, D. S.; TAI, E. S. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the Young (MODY). *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* V.5, p.101–108, 2012

GILLETTE MU, MITCHELL JW. Signaling in the suprachiasmatic nucleus: selectively responsive and integrative. *Cell Tissue Res.* 309(1):99-107.2002.

GIROIX MH , IRMINGER JC , LACRAZ L , NOLL C , CALDERARI S , EHSES JA , COULAUD J , CORNUT H , KASSIS N , SCHMIDLIN F , PAUL JL , KERGOAT H , JANEL N , HALBAN PA , HOMO-DELARCHE F. Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto–Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia*. 54 (9): 2451-62. doi: 10.1007 / s00125-011-2223-4.2011.

GOTO Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad.* v. 5, p. 80-85, 1975.

GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J. exp. Med.*, v. 119 p. 85-90, 1976.

GROOP L, PRASAD R.B. Genetics of Type 2 Diabetes: It Matters From Which Parent We Inherit the Risk. *Rev Diabet Stud*, 12(3-4):233-242.2015.

GAUGUIER D, FROGUEL P, PARENT V, BERNARD C, BIHOREAU MT, PORTHA B, JAMES MR, PENICAUD L, LATHROP M, KTORZA A. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non-insulin dependent diabetes in the GK rat. **Nat Genet.**;12(1):38-4.1996.

HARDELAND, R. Melatonin and the pathologies of weakened or dysregulated circadian oscillators. **J Pineal Res.**, v 62, ed.12, p.377, 2017.

HARDIE DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. **Endocrinology.** 144:5179-83.2003.

HARRISON, S., PAGE, C.P. & SPINA, D. Airway nerves and protein phosphatases. **Gen Pharmacol** 32, 287-98 (1999).

HIRATA, A.E. et al. Modulation of IR/PTP1B interaction and downstream signaling in insulin sensitive tissues of MSG-rats. **Life Sci** 73, 1369-81 (2003).

HOTAMISLIGIL GS, PERALDI P, BUDAVARI A, ELLIS R, WHITE MF, Spiegelman BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosinekinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. **Science.**;271(5249):665-8.1996.

HUANG HH, FARMER K, WINDSCHEFFEL J, YOST K, POWER M, WRIGHT DE, STEHNO-BITTEL L. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. **Exp Diabetes Res.**2011:481427. doi: 10.1155/2011/481427.2011.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes atlas. 10th ed. 2018.

JØRGENSEN SB, RICHTER EA, WOJTASZEWSKI JF. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. **J. Physiol.** 574 (Pt 1): 17-31.2006.

KANTER, M., UYSAL, H., KARACA, T., SAGMANLIGIL, H.O. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic beta-cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Arch. Toxicol.**, v. 80, n. 6, p. 362-369, 2006.

KAPPERS JA. The development, topographical relations and innervation of the epiphysis cerebri in the albino rat. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Volume 52, Issue 2, pp 163–215.1960.

KASUGA M, KARLSSON FA, KAHN CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. **Science.** 8;215(4529):185-7.1982.

KELLEY DE, HE J, MENSHIKOVA EV, RITOV VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes.** 51(10):2944-50.2002.

KIM, K. H.; WOO, H. Y.; LIM, S. W. Association Study of a Serotonin Receptor 2A Gene -1438A/G Polymorphism and Anxiety-Related Traits. **Psychiatry Investig.** Dec;5(4):244-6. 2008.

KING K.M, RUBIN G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. **British Journal of Nursing**. Vol. 12, No. 18.2003.

KOISTINEN. A; ZIERATH J.R. Regulation of glucose transport in human skeletal muscle. **Ann Med.**; V. 34, n 6, p.410-418, 2002.

KORF, H.W. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. In: OLCESE, J. Melatonin After Four Decades. New York: **Kluwer/Plenum**. p. 17–29.2000.

KUWABARA WMT, PANVELOSKI-COSTA AC, YOKOTA CNF1, PEREIRA JNB1, FILHO JM, TORRES RP, HIRABARA SM, CURI R, ALBA-LOUREIRO TC. Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? **PLoS One**.12(12):e0189622. doi: 10.1371/journal.pone.0189622.2017.

JAIN D, WEBER G, EBERHARD D, MEHANA AE, EGLINGER J, WELTERS A, BARTOSINSKA B, JERUSCHKE K, WEISS J, PÄTH G, ARIGA H, SEUFERT J, LAMMERT E. DJ-1 Protects Pancreatic Beta Cells from Cytokine- and Streptozotocin-Mediated Cell Death. **PLoS One**.30;10(9):e0138535.doi: 10.1371/journal.pone.0138535. 2015.

JESSEN N, GOODYEAR LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. **J Appl Physiol** ;99(1):330-7.2005.

LEIBOWITZ, A.; PELEG, E.; SHARABI, Y.; SHABTAI, Z.; SHAMISS, A.; GROSSMAN, E. The role of melatonin in the pathogenesis of hypertension in rats with metabolic syndrome, **Am. J. Hypertens.**, v. 21, p.348–351, 2008.

LAITINEN S, STAELS B. Potential roles of ROR- $\alpha$  in cardiovascular. **Endocrinology**. Nucl Recept Signal. Published online. doi: 10.1621/nrs.01011.2003.

LIMA, F.B.; MACHADO, U.F.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; MORAES, S.M.F.; HELL, N.S.; OKAMOTO, M.N.O.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R.O.; CIPOLLA-NETO, J. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am. J. Physiol.**, v. 275, p. E934- E941. (Endocrinol. Metab., 38).1998.

LINNEMANN AK, BLUMER J, MARASCO MR, BATTIOLA TJ, UMHOEFER HM, HAN JY3, LAMMING DW, DAVIS DB. Interleukin 6 protects pancreatic  $\beta$  cells from apoptosis by stimulation of autophagy. **FASEB J**.31(9):4140-4152. doi: 10.1096/fj.201700061RR.2017.

NEWSHOLME, E.A.; DIMITRIADIS, G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes**. v.109, Suppl., 2, p.122–34, 2001.

NUUTILA P, KOIVISTO VA, KNUUTI J, RUOTSALAINEN U, TERÄS M, HAAPARANTA M, BERGMAN J, SOLIN O, VOIPIO-PULKKI LM, WEGELIUS U.

Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. **J Clin Invest.**, v. 89(6):1767-74.1992.

MATAFOME P, NUNES E, LOURO T, AMARAL C, CRISÓSTOMO J, RODRIGUES L, MOEDAS AR, MONTEIRO P, CIPRIANO A, SEIÇA R. A role for atorvastatin and insulin combination in protecting from liver injury in a model of type 2 diabetes with hyperlipidemia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*379(3):241-51. doi: 10.1007/s00210-008-0363-y.2009.

MAZEPA RC, CUEVAS MJ, COLLADO PS, GONZÁLEZ-GALLEGO J. Melatonin increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. **Life Sci.** v., 66(2):153-60.2000.

MCARDLE, W. D.; KATCH, F. L.; KATCH, V. L.; **Fisiologia do Exercício; Energia, Nutrição e Desempenho Humano.** Ed. Guanabara Koogan; 6 ed.; Rio de Janeiro, 2015.

MCMULLAN, C. J.; SCHERNHAMMER, E. S.; RIMM, E. B.; HU, F. B.; FORMAN, J. P. Melatonin secretion and the incidence of type 2 diabetes. **JAMA**, v.309, p.1388–96, 2013.

MELO, R. M. Efeitos da suplementação com melatonina e do treinamento físico aeróbio sobre o perfil metabólico de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. 2012. 75 f. **Tese (Doutorado)** - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MENDES C, LOPES AM, DO AMARAL FG, PELICIARI-GARCIA RA, TURATI ADE O, HIRABARA SM, SCIALFA FALCÃO JH, CIPOLLA-NETO J. Adaptations of the aging animal to exercise: role of daily supplementation with melatonin. **J Pineal Res.** 2013 Oct;55(3):229-39. doi: 10.1111/jpi.12065. Epub 2013.

MOLLER M.D. Fine structure of the pinealopetal innervation of the mammalian pineal gland. **First published.**10.1002/jemt.1070210303.1992.

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.**25(2):94-100.1998.

MORGAN, P.; BARRET, P.; HOWELL, H.; HELLIWEL, R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. **Neurochem. Int.**,v. 24, p. 101-146, 1994.

MOVASSAT J, PORTHA B. Early administration of keratinocyte growth factor improves  $\beta$ -cell regeneration in rat with streptozotocin-induced diabetes. **J Endocrinol.**,195(2):333-40.2007.

MOVASSAT, J., BAILBE, D., LUBRANO-BERTHELIER, C., PICAREL-BLANCHOT, F., BERTIN, E., MOUROT, J. O acompanhamento de ratos GK durante o pré-diabetes destaca o aumento da ação da insulina e a deposição de gordura, apesar da



baixa secreção de insulina. *Sou. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E168-E175. doi: 10.1152 / ajpendo.00501.2008.

MYERS, M. G. et al. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 89, n. 21, p. 10350-10354, 1992.

NATALICCHIO A, MARRANO N, BIONDI G, SPAGNUOLO R, LABARBUTA R, PORRECA I, CIGNARELLI A, BUGLIANI M, MARCHETTI P, PERRINI S, LAVIOLA L, GIORGINO F. The Myokine Irisin Is Released in Response to Saturated Fatty Acids and Promotes Pancreatic  $\beta$ -Cell Survival and Insulin Secretion. **Diabetes.**66(11):2849-2856. doi: 10.2337/db17-0002.2017.

NEWTON CA, RASKIN P. Diabetic ketoacidosis in type 1 and type2 diabetes mellitus: clinical and biochemical differences. **ArchIntern Med.**164(17):1925-31.2004.

NISHIDA, S.; SEGAWA, T.; MURAI, I.; NAKAGAWA, S. Long-term melatonin administration reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositives in type 2 diabetic rats via the restoration of D-5 desaturase activity. **J. Pineal Res.**, v. 32, p. 26–33, 2002.

NEWSHOLME, E.A.; DIMITRIADIS, G. Integration of biochemical and physiologic effects of insulin on glucose metabolism. **Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.** v.109, Suppl., 2, p.122–34, 2001.

NOGUEIRA TC, LELLIS-SANTOS C, JESUS DS ET AL. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. **Endocrinology.** v., 152:1253–1263.2011.

NARENDRAN P, SOLOMON TP, KENNEDY A, CHIMEN M, ANDREWS RC. The time has come to test the beta cell preserving effects of exercise in patients with new onset type 1 diabetes. *Diabetologia.*58(1):10-8. doi: 10.1007/s00125-014-3412-8.2015.

NUUTILA P, KOIVISTO VA, KNUUTI J, RUOTSALAINEN U, TERAS M, HAAPARANTA M, et al. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heartand skeletal muscle in vivo. **The J Clin Invest.**89(6):1767-74;1992.

OHAROMARI LK, DE MORAES C, NAVARRO AM. Exercise Training but not Curcumin Supplementation Decreases Immune Cell Infiltration in the Pancreatic Islets of a Genetically Susceptible Model of Type 1 Diabetes. *Sports Med Open.*(1):15. doi: 10.1186/s40798-017-0082-3.2017.

PANG DT, SHARMA BR, SHAFER JA, WHITE MF, KAHN CR. Predominance of tyrosine phosphorylation of insulin receptors during the initial response of intact cells to insulin. **J Biol Chem.** v., 10;260(11):7131-6.1985.

PANG S.C, BROWN M.B, TANG L.P. G-protein linked melatonin binding sites in the chicken lung. **Neuroscience Letters.** v., 162, Issues 1–2, 12, Pages 17-20.1993.

PARK JH, SHIM HM, NA AY, BAE KC, BAE JH, IM SS, CHO HC, SONG DK. Melatonin prevents pancreatic beta-cell loss due to glucotoxicity: the relationship between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. **J Pineal Res.** v.,56:143–153 doi: 10.1111/jpi.12106.2014.

PAULA FM, LEITE NC, VANZELA EC, KURAUTI MA, FREITAS-DIAS R, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC, ZOPPI CC. Exercise increases pancreatic  $\beta$ -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. **FASEB J.**29(5):1805-16. doi: 10.1096/fj.14-264820.2015.

PAULA FMM, LEITE NC, BORCK PC, FREITAS-DIAS R, CNOP M, CHACON-MIKAHIL MPT, CAVAGLIERI CR, MARCHETTI P, BOSCHERO AC, ZOPPI CC, EIZIRIK DL. Exercise training protects human and rodent  $\beta$  cells against endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **FASEBJ.**32(3):1524-1536. doi: 10.1096/fj.201700710R.2018.

PAULI JR, ROPELLE ER, CINTRA DE CARVALHO FILHO MA, MORAES JC, DE SOUZA CT, ET AL. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein Kinase B/Akt in dietary induced obese Wistar rats. **J Physiol.**,586:659-71; 2007.

PETERSEN AM, PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol.**,v98(4):1154-62, 2005.

PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology.**, v. 146, n. 3, p. 1576-1587, 2005.

PICINATO, M.C.; HIRATA, A.E.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.; ANHÊ, G.F.; CARPINELLI, A.R. Activation of insulin and IGF-1 signaling pathways by melatonin through MT1 receptor in isolated rat pancreatic islets. **J. Pineal Res.**, v. 44, n. 1, p. 88-94, 2008.

PORTHA B1, LACRAZ G, KERGOAT M, HOMO-DELARCHE F, GIROIX MH, BAILBÉ D, GANGNERAU MN, DOLZ M, TOURREL-CUZIN C, MOVASSAT J. The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? **Mol Cell Endocrinol.**,v297(1-2):73-85. doi: 10.1016/.2009.

QU D, LIU J, LAU CW, HUANG Y. IL-6 no diabetes e complicações cardiovasculares. **Br J Pharmacol.**171 (15): 3595-603. doi: 10.1111 / bph.12713.2014.

RAJALA MW, SCHERER PE. MINIREVIEW.The adipocyte - at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology.** v., 144:3765-73.2003.

RASMUS POLD, LASSE S. JENSEN, NIELS JESSEN, ESBEN S. BUHL, OLE SCHMITZ, ALLAN FLYVBJERG, NOBUHARU FUJII, LAURIE J. GOODYEAR, CARSTEN F. GOTFREDSEN, CHRISTIAN L. BRAND, STEN LUND. Long-Term AICAR Administration and Exercise Prevents Diabetes in ZDF Rats. **Diabetes.**,v 54(4): 928-934.2005.

REITER R.J. Neuroendocrine effects of light. **Int J Biometeorol.**,v35(3):169-75.1991.

REITER R.J. TAN D.X. Melatonin relieves the neural oxidative burden that contributes to dementias. **Ann N Y Acad Sci.**,v1035:179-96.2004.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.; GODSON, C. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 17, p. 100-102, 1996.

RIOS-LUGO MJ, JIMENEZ-ORTEGA V, CANO-BARQUILLA P, MATEOS PF, SPINEDI EJ, CARDINALI DP, ET AL.Melatonin counteracts changes in hypothalamic gene expression of signals regulating feeding behavior in high-fat fed rats. *Horm Mol Biol Clin Investig.*, v. 21:175–83.10.1515/hmbci-2014-0041.2010.

RIOS-LUGO, M. J.; CANO, P.; JIMENEZ-ORTEGA, V.; FERNÁNDEZ-MATEOS, M.P.; SCACCHI, P. A.; CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I. Melatonin effect on plasma adiponectin, leptin, insulin, glucose, triglycerides and cholesterol in normal and high fat-fed rats, *J. Pineal Res.*, v. 49, p.342–348, 2010.

ROPELLE ER, PAULI JR, PRADA PO, DE SOUZA CT, PICARDI PK, CINTRA DE, ET AL. Reversal of diet-induced insulin resistance with single bout of exercise in the rat the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol.*; v.577:997-1007. 2007.

ROPELLE ER, FLORES MB, CINTRA DE, ROCHA GZ, PAULI JR, MORARI J, DE SOUZA CT, MORAES JC, PRADA PO, GUADAGNINI D, MARIN RM, OLIVEIRA AG, AUGUSTO TM, CARVALHO HF, VELLOSO LA, SAAD MJ, CARVALHEIRA JB. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biology.*, v. 10:1000465. doi: 10.1371/journal.pbio.1000465.2010.

ROPELLE ER, PAULI JR, FERNANDES MF, ROCCO SA, MARIN RM, MORARI J, SOUZA KK, DIAS MM, GOMES-MARCONDES MC, GONTIJO JA, FRANCHINI KG, VELLOSO LA, SAAD MJ, CARVALHEIRA JB.A central role for neuronal AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) in high-protein diet-induced weight loss. **Diabetes.**,v.57(3):594-605. 2007

RUI BB, CHEN H, JANG L1, LI Z, YANG JM, XU WP, WEI W. Melatonin upregulates the activity of AMPK and attenuates lipid accumulation in alcohol-induced rats. *Alcohol Alcohol.* 51(1):11-9. doi: 10.1093/alcalc/agt126.2016.

RUBIO-SASTRE, P.; SCHEER, F. A.; GÓMEZ-ABELLÁN, P.; MADRID, J. A.; GARAULET, M. Acute melatonin administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening. **Sleep.**, v.37, p.1715–19, 2014.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature.**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.

SATO S, BASSE AL, SCHÖNKE M, CHEN S, SAMAD M, ALTINTAŞ A, LAKER RC, DALBRAM E, BARRÈS R, BALDI P, TREEBAK JT, ZIERATH JR, SASSONE-CORSI P. Time of Exercise Specifies the Impact on Muscle Metabolic Pathways and

Systemic Energy Homeostasis. **Cell Metab.** 2;30(1):92-110.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.013.2019.

SHAW RJ, LAMIA KA, VASQUEZ D, KOO SH, BARDEESY N, DEPINHO RA, ET AL. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science.**, v.310:1642-6.2005.

SCHINNER, S. et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. **Diabetic Medicine.**, v. 22, n. 6, p. 674-682, 2005.

SIMSEK N, KAYA M, KARA A, CAN I, KARADENIZ A, KALKAN Y. Effects of melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats: an immunohistochemical study. **Domest Anim Endocrinol.**43(1):47-57. doi: 10.1016/j.domaniend.2012.02.002.2012.

SKYLER JS, BAKRIS GL, BONIFACIO E, DARSOW T, ECKEL RH, GROOP L ET AL. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes.**, v. 66(2):241-55.2017.

SMIRNOV VE, MANVELOV LS. Risk factors of vascular brain disorders in patients with diabetes mellitus. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.**, v.(Suppl 3):8-15.2001.

SMITH AG, MUSCAT GE. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 37(10):2047-63.2005.

SOARES AF, NISSEN JD, GARCIA-SERRANO AM, NUSSBAUM SS1, WAAGEPETERSEN HS, DUARTE JMN. Glycogen metabolism is impaired in the brain of male type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **J Neurosci Res.**97(8):1004-1017. doi: 10.1002/jnr.24437.2019.

SONG, X. M. et al. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. **Diabetes.**, v. 48, n. 3, p. 664-670, 1999.

STEINHILBER, D.; BRUNGS, M.; WERZ, O.; WIESENBERG, I.; DANIELSSON, C.; KAHLLEN, J.P.; The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 270(13):7037-40. 1995.

SUGDEN M.C, LALL H.S, HARRIS R.A. Selective modification of the pyruvate dehydrogenase kinase isoform profile in skeletal muscle in hyperthyroidism: implications for the regulatory impact of glucose on fatty acid oxidation. **J Endocrinol.**, v. 167(2):339-45.2000.

TAN D.X REITER RJ, MANCHESTER LC. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Curr Top Med Chem.**, v. 2(2):181-97.2002.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights in to insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, ed. 7, v.2, p.85-96, 2006.

TEIXEIRA, P. S. A. Caracterização do treinamento físico experimental de endurance em esteira adaptada através de marcadores metabólicos energéticos. 2010. 172 f. **Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)** – Centro de Ciências da saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2010.

TEKULA S, KHURANA A, ANCHI P, GODUGU C. Withaferin-A attenuates multiple low doses of Streptozotocin (MLD-STZ) induced type 1 diabetes. **Biomed Pharmacother.** 106:1428-1440. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.090.2018.

ULLRICH, A.; SCHLESSINGER, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. **Cell.**, v.61, p.203–212, 1990.

VAN-GEIJLSWIJK, I.; KORZILIUS, H. P.; SMITS, M. G. The use of exogenous melatonin in delayed sleep phase disorder: a meta-analysis. **Sleep**, v. 33, p.1605–1, 2010.

VILLAR-PALASI C, FARESE RV. Impaired skeletal muscle glycogen synthase activation by insulin in the Goto-Kakizaki (G/K) rat. **Diabetologia.**37(9):885-8.1994.

VOLLRATH, L. The pineal organ. In: OKSCHE, A.; VOLLRATH, L. **Handbuch Der Mikroskopischen Anatomie Des Menschen.**, v. 6/7. Berlin: Springer, 1981.

WAJCHENBERG BL1, SANTOMAURO AT, GIANNELLA-NETO D, BORGHI VC, PORRELLI RN. Short- and long-term gliclazide effects on pancreatic islet cell function and hepatic insulin extraction in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.**, v. 17(2):89-97.1992.

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.**, v. 141:487–97.10.1210.141.2.7311.2000.

WOJTASZEWSKI JF, RICHTER EA. Effects of acute exercise and training on insulin action and sensitivity: focus on molecular mechanisms in muscle. **Essays Biochem.**, v. 42:31-46.2006.

WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, n. 6670, p. 900-904, 1998.

ZANQUETTA, M. M.; SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Calorie restriction reduces pinealectomy-induced insulin resistance by improving GLUT4 gene expression and its translocation to the plasma membrane. **J. Pineal Res.**, v. 35 p.141–148, 2003.

ZICK Y. Molecular basis of insulin action. **Novartis Found Symp.**262:36-50; discussion 50-5, 2.2004

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J.; Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature.**, v. 414: 782-7, 2001.

ZIRATH J.R.; KROOK A., WALLERH-HERIKSSON H. Insulin resistance in human skeletal muscle. **Diabetologia.**, v. 43, 7, p. 821-835, 2000.