

Ariane de Oliveira Turati

**ANÁLISE DO PERFIL DIÁRIO E DOS MECANISMOS DE SÍNTESE DA
MELATONINA PINEAL EM RATOS DIABÉTICOS POR ESTREPTOZOTOCINA
TRATADOS COM INSULINA**

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

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. José Cipolla Neto

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

TURATI, A. O. **Análise do perfil diário e dos mecanismos de síntese da melatonina pineal em ratos diabéticos por estreptozotocina tratados com insulina.** 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Existem evidências sobre a queda na síntese de melatonina associada ao diabetes tipo I. A melatonina é o principal hormônio produzido pela glândula pineal durante o escotoperíodo e atua na regulação de diversos processos fisiológicos, dentre eles o metabolismo energético. A associação entre a redução de tal hormônio e o diabetes tipo I pode explicar diversas complicações relacionadas a esta patologia, como a menor capacidade antioxidativa que organismos com essa condição apresentam. O presente estudo teve como objetivo verificar se a administração de insulina em animais diabéticos tipo I levaria a reversão na síntese de melatonina. Para tanto, animais de grupos independentes ou submetidos à microdiálise foram induzidos ao diabetes por estreptozotocina (60 mg/Kg), permanecendo nessa condição por 15 dias. Do terceiro dia da indução até o término do período os animais receberam a reposição de insulina duas vezes ao dia, antes do início da noite e após o começo da fase clara. A glicemia e o peso foram aferidos ao logo do bloco experimental. Os animais receberam água e alimento à vontade. No dia 15, os animais foram pesados e foi realizada a eutanásia de forma circadiana destes. A melatonina foi dosada a partir da glândula pineal, por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica (HPLC) e foram procedidos os testes para o conteúdo proteico (Western blot) e atividade enzimática da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), assim como para o conteúdo de AMPc (ELISA) e para a atividade da Na^+/K^+ ATPase (ensaio colorimétrico). A glicemia foi aferida no momento da eutanásia. Não foram constatadas alterações transcricionais envolvendo os receptores adrenérgicos presentes na glândula e as principais enzimas da via de síntese da indolamina em questão, conforme avaliado por RT-PCR. Foi possível verificar que houve reversão na queda da síntese de melatonina nos animais diabéticos tratados com insulina, de forma que esses apresentaram concentração hormonal semelhante àquela verificada para animais controles. Já os animais diabéticos revelaram queda na síntese hormonal, ganho de peso reduzido e altos índices glicêmicos. De tal maneira, a reversão na síntese de melatonina revela uma forte relação entre a melatonina e a insulina. O hormônio pancreático parece modular a produção de melatonina. A normalização glicêmica em função do tratamento com insulina parece ser o fator preponderante para o reestabelecimento do nível de AMPc pineal, assim como do conteúdo proteico e da atividade da AANAT e, por conseqüência, para a reversão na produção de melatonina na glândula pineal já constatada após 2 dias do início do tratamento com insulina, conforme evidenciado por microdiálise. De tal maneira, a hiperglicemia aparece como o fator responsável pela desregulação da síntese da indolamina pineal, conforme constata-se pela cultura de células isoladas de pineais de animais controles em meio com elevada concentração de glicose. Ainda, essa desregulação pode estar atrelada ao funcionamento inadequado da Na^+/K^+ ATPase na glândula pineal.

Palavras-chave: Melatonina. Diabetes mellitus tipo I. Insulina. Hiperglicemia.

ABSTRACT

TURATI, A. O. **Pineal melatonin synthesis daily profile and mechanisms in streptozotocin diabetic rats treated with insulin.** 2013. 84 p. Masters thesis (Human Physiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

There is evidence about the decrease in melatonin synthesis associated with type I diabetes. Melatonin is the principal hormone produced by the pineal gland during the dark period and acts on the regulation of various physiological processes, including the energy metabolism. The association between the reduction of this hormone and type I diabetes can explain various complications related to this pathology, as the reduced antioxidant capacity. The aim of the present study was to verify whether the administration of insulin to type I diabetic animals would lead to reversal in the synthesis of melatonin. Therefore, Wistar rats were rendered diabetic by streptozotocin (60 mg/Kg) and kept like that for a period of 15 days. From the third day of induction until the end of the period, the animals received the replacement of insulin, twice a day before the beginning and after the end of the dark period. Blood glucose and weight were measured during the experiment period. Animals received water and food ad libitum. On the 15th day, the animals were weighed and euthanized every 3 hours around the clock. Pineal melatonin was measured by high efficiency liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC), arylalkylamine-N-acetyltransferase (AANAT) protein (Western blot) and activity (radiometric assay) were also evaluated, as well as pineal AMPc content (ELISA) and Na⁺/K⁺ pump activity (colorimetric assay). Blood glucose was measured at the time of euthanasia. No difference in gene expression of the adrenergic receptors and main enzymes involved in melatonin synthesis was found by qPCR in pineal gland. It was possible to verify the restoration in melatonin synthesis in insulin-treated diabetic animals, as they presented similar levels of the pineal hormone observed in control animals. On the other hand, diabetic animals without insulin replacement exhibited a severe reduction in melatonin synthesis, lower weight gain and high blood glucose mean. Altogether, the reversal in impaired melatonin production in insulin-treated animals reveals a strong relation between melatonin and insulin. The pancreatic hormone seems to modulate pineal hormone synthesis. The glycemic adjustment due to insulin replacement in diabetic models appears to be crucial for appropriated pineal gland's physiology, since insulin-treated animals showed normal AMPc content, AANAT protein levels and activity and, consequently, regular melatonin production, observed after 2 days from the beginning of insulin treatment as noticed by microdialysis technique. Pineal cell culture corroborates the prejudicial effect of high glucose concentration evaluated *in vivo*. Such effect might be associated with inappropriate function of Na⁺/K⁺ pump.

Keywords: Melatonin. Type 1 diabetes mellitus. Insulin. Hyperglycemia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glândula pineal

Primeiramente descrita por Galeano de Pérgamo entre os séculos III e IV a.C, a glândula pineal recebeu diversas atribuições desde então, sendo até mesmo considerada a “sede da alma” por René Descartes (ARENDR, 1995).

A denominação da glândula pineal deriva de seu formato verificado em seres humanos, semelhante a uma pinha, com dimensão aproximada de 6 mm em seu maior eixo. Sua origem embrionária está associada a uma evaginação do III ventrículo, constituindo uma parte do epítalamo. Em seres humanos está localizada acima dos colículos superiores, na região posterior do teto diencefálico (CALDAS et al., 1998).

A glândula pineal passa de um órgão predominantemente fotossensível em algumas classes de vertebrados, como peixes, anfíbios, répteis e aves (COLLIN, 1971) para uma estrutura de caráter neuroendócrino em mamíferos, recebendo informações indiretas a respeito da iluminação ambiental por meio da via retino-hipotalâmica e do sistema nervoso simpático (VOLLRATH, 1981). Tal alteração da condição fotossensível para a neuroendócrina é reforçada por mudanças morfológicas e funcionais sofridas pelo principal constituinte celular da glândula pineal, o pinealócito. Observações filogenéticas a respeito desse tipo celular indicam queda na quantidade das variedades fotoreceptoras e crescente predomínio de pinealócitos neurosecretores conforme nos aproximamos dos mamíferos na escala evolutiva (EKSTRÖM; MEISSEL, 2003).

Sua função está associada à sincronização entre os ritmos endógenos e o ritmo de claro-escuro ambiental de aproximadamente 24 horas, ou seja, o ritmo circadiano, de forma que a produção de melatonina ocorre exclusivamente no período do escuro, também chamado de escotoperíodo, independente do momento de maior atividade da espécie considerada. Assim, por sua presença plasmática a melatonina indica ao organismo o período noturno, enquanto a duração do episódio secretório noturno representa a sazonalidade (REITER, 1993).

A glândula pineal atua como um temporizador interno, tendo como mediadora a melatonina e estando associada a diversos processos que vão desde a coordenação dos ritmos circadianos e sazonais até a regulação de processos

endócrinos, metabólicos, reprodutivos, imunes e de função cardiovascular. A melatonina pode ainda ser considerada um marcador ontogenético, considerando a variação de sua produção em cada fase da vida, sendo maior na infância e reduzida na velhice (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

Existem outros locais de síntese da melatonina, tais como a retina e o sistema gastrointestinal, entretanto acredita-se que a melatonina sintetizada nestas regiões tenha maior importância na modulação de fenômenos locais (ARENDR, 1995).

1.2 Melatonina

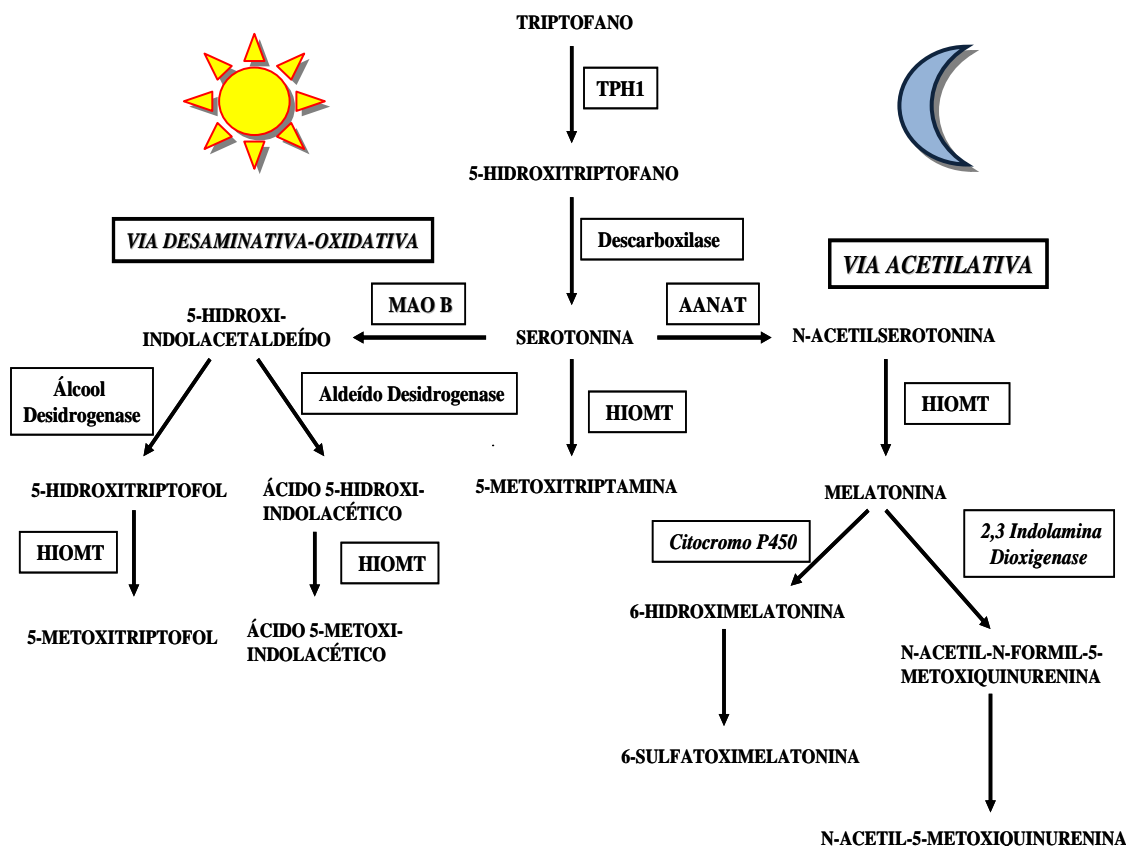
A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina de peso molecular 232,3 que foi isolada em 1958 a partir de glândulas pineais bovinas (LERNER et al., 1958).

Sua denominação deveu-se a primeira propriedade identificada e que estava associada a coloração de pele de anfíbios e peixes (HARDELAND et al., 2011). No entanto, foi apenas na década de 80 que a melatonina tornou-se de alvo de interesse por seu papel regulatório dos ritmos circadianos em diversos organismos.

É válido ressaltar que tal papel foi considerado como função principal e quase exclusiva da indolamina em questão por muitos anos até o surgimento de novos estudos apontando para a diversidade de estruturas que a produzem, ampla distribuição de receptores, variedade quanto a sinalização e função intracelular, assim como multiplicidade de órgãos-alvo, conforme indicam HardeLand et al., 2011.

Sua síntese ocorre a partir do aminoácido essencial triptofano que é transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela triptofano hidroxilase 1 (TPH1, EC 1.14.16.4). O 5-HTP passa por uma descarboxilação catalisada pela descarboxilase de l-aminoácidos aromáticos (EC 4.1.1.28) que resulta na formação de serotonina (5-HT). A serotonina é então acetilada pela arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT, EC 2.3.1.87) e transformada em N-acetilserotonina (NAS), que tem o grupamento hidroxila trocado por um metil pela ação da hidroxindol-oximetiltransferase (HIOMT, EC 2.1.1.4), culminando na formação da melatonina (CIPOLLA-NETO et al., 1999). O processo descrito acima está representado na Figura 1 localizada a seguir.

Figura 1 - Vias metabólicas existentes na glândula pineal.



A figura representa as vias metabólicas de síntese e degradação da melatonina e de outros indóis na glândula pineal

Fonte: Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche, 2008.

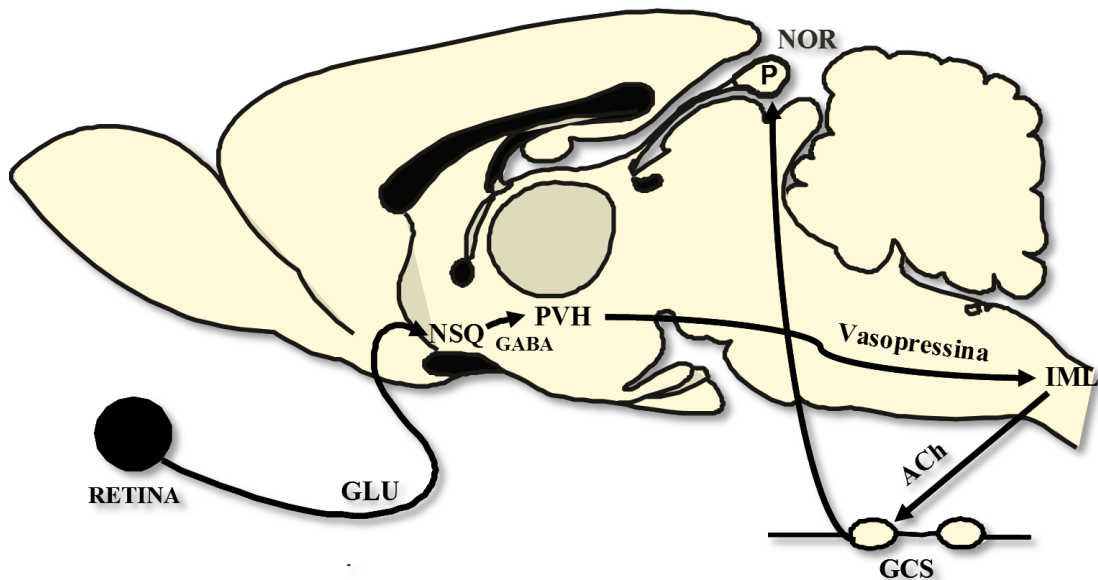
1.2.1 Melatonina e estimulação noradrenérgica

O controle neural do metabolismo da glândula pineal origina-se no núcleo paraventricular do hipotálamo que se projeta para coluna intermédio-lateral da medula torácica alta, nos neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo simpático. Estes neurônios projetam-se então para os gânglios cervicais superiores, cujos neurônios pós-ganglionares chegam a glândula pineal através dos ramos carotídeos internos e nervos conários (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

O ritmo da síntese diária de melatonina é sincronizado ao ciclo claro-escuro ambiental a partir da informação que segue pela via retino-hipotalâmica, resultando em queda na inibição do núcleo paraventricular, a qual era resultante da liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) pelo núcleo supraquiasmático quando em presença do estímulo luminoso (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

A Figura 2 representa as estruturas neurais envolvidas no controle da síntese de melatonina, assim como no estabelecimento de sua sincronia com a iluminação ambiental.

Figura 2 - Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina pineal



Vias neurais do controle diário da síntese de melatonina pineal e os principais neurotransmissores envolvidos. GLU: glutamato; NSQ: núcleo supraquiasmático; GABA: ácido gama-aminobutírico; PVH: núcleo paraventricular hipotalâmico; IML: coluna intermédio-lateral da medula espinal; Ach: acetilcolina; GCS: gânglio simpático cervical superior; P: pineal; NOR: noradrenalina. Fonte: Adaptado de Cipolla-Neto e Afeche, 2008.

Assim, a ativação noturna da via neural de projeção periférica para a glândula pineal induz a liberação de noradrenalina nas proximidades dos pinealócitos, os quais apresentam receptores α e β -adrenérgicos (VANECK et al., 1985). Da interação com os receptores β (subtipo β_1) há indução do aumento do monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) intracelular através da ativação de proteína G estimulatória (Gs) e da enzima adenilil ciclase (AC). Além da via desencadeada pela atuação da noradrenalina em receptores β na pineal, principal responsável pela elevação noturna do conteúdo da indolamina, a estimulação de receptores adrenérgicos α_1 também contribui de forma sinérgica para o aumento gerado nos níveis de AMPC, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como reflexo da potenciação da ativação da enzima adenilil ciclase (AC) (KLEIN et al., 1983), em processos

envolvendo o aumento no influxo de cálcio com consequente ativação da proteína quinase depende desse íon (PKC) (SUGDEN et al., 1985, 1986, 1987).

Ainda, o cálcio tem um papel potenciador da síntese do AMPc intracelular também por atuar através do complexo cálcio/calmodulina na ativação da adenilil ciclase, que na glândula pineal foi caracterizada como sendo do tipo 1 (TZAVARA et al., 1996).

Um regulador negativo do AMPc na glândula pineal é a variante PDE4B2, uma fosfodiesterase identificada na pineal de ratos e que exhibe flutuação diária com aumento na segunda metade da noite de seis vezes em sua expressão gênica em função do estímulo adrenérgico da via do próprio AMPc e da proteína quinase dependente do AMPc (PKA). O aumento no RNA mensageiro (mRNA) de PDE4B2 se reflete diretamente no conteúdo proteico e na atividade enzimática, contribuindo para a redução de melatonina nos momentos finais da noite (KIM et al., 2007).

1.2.2 Enzimas da via de síntese da melatonina

1.2.2.1 TPH 1

A triptofano hidroxilase 1 (TPH1) caracteriza a enzima mais importante da via de síntese da serotonina na glândula pineal, dada a variação de sua atividade ao longo do dia, enquanto a descarboxilase tem sua expressão constitutiva durante as 24 h.

É importante destacar que o conteúdo de serotonina apresenta variações circadianas na pineal (KLEIN; WELLER, 1970), com valores altos durante a fase clara e elevação logo no começo da noite, seguido de queda abrupta associada a geração de N-acetilserotonina e melatonina. Esse aumento noturno está associado a fosforilação de TPH1 em serina 58 pela PKA, fato desencadeado pelo aumento de AMPc resultante do estímulo noradrenérgico nos adrenoreceptores presentes na glândula pineal. Assim, há uma regulação pós-traducional modulando a sua atividade durante a noite. O ritmo de serotonina se mantém mesmo na condição de escuro constante, revelando o caráter endógeno dessa oscilação (HUANG et al., 2008).

1.2.2.2 AANAT

Os primeiros estudos destacando a relevância da AANAT para a síntese de melatonina pineal avaliaram os resultados da estimulação noradrenérgica na elevação do conteúdo dos segundos mensageiros celulares, o que estava associado a modulação da atividade dessa enzima, que exhibe clara ritmicidade ao longo das 24 horas com elevação noturna correspondendo ao período de síntese da melatonina (KLEIN et al., 1970; KLEIN; WELLER, 1970, 1972; PARFITT et al., 1976; YU et al., 1993).

Grande parte das investigações a respeito da transcrição rítmica da AANAT envolveram modelos murinos, assim como cultura de pinealócitos ou do órgão pineal *in situ*. Roseboom et al., 1996 evidenciaram um aumento dependente da atuação da noradrenalina em receptores β e da sinalização por AMPc de cento e cinquenta vezes na expressão da AANAT em pineais de ratos, processo de ocorrência predominantemente noturna.

Estudos *in vivo* investigando a dinâmica entre os eventos de estimulação noradrenérgica, aumento de AMPc, ativação de PKA e maior transcrição da AANAT com consequência direta na síntese noturna de melatonina evidenciaram a atuação dos fatores de transcrição do elemento de ligação responsivo ao AMPc (CREB) e do elemento inibidor responsivo ao AMPc (ICER) para ratos. O fator CREB torna-se ativo mediante sua fosforilação (pCREB) em serina 133 via PKA que tem lugar na primeira parte da noite, o que está relacionado a manutenção de elevadas taxas de transcrição, como é observado para o gene da AANAT. Esse fenômeno se sobrepõe à ação inibitória de ICER até o ponto em que tem início a desfosforilação de CREB, independente da continuidade do estímulo por noradrenalina. Em paralelo a queda no conteúdo de pCREB, eleva-se a proteína de ICER, que compete pela ligação em CRE regulando negativamente a transcrição gênica da AANAT e de outros genes e corroborando para a queda de melatonina durante a noite (MARONDE et al., 1999). Em tal processo, a atuação de fosfatases de serina/treonina, mais especificamente da variante 1 de ação nuclear, a PSP 1, contribui para a queda no conteúdo de pCREB em pinealócitos de ratos (KOCH et al., 2003).

Antes da elucidação de processos moleculares da transcrição da AANAT, alguns estudos já apontavam para uma associação entre a atividade dessa enzima e as variações no conteúdo de AMPc. Assim, era observado que análogos de AMPc

atuavam como favorecedores do processo de acetilação da serotonina em pineal de ratos (KLEIN et al., 1970), enquanto a queda no conteúdo de AMPc por redução em sua síntese ou crescente metabolização eram associados a interrupção na atividade da AANAT em cultura de pinealócitos (KLEIN et al., 1978).

O aumento da transcrição da enzima, em torno de cento e cinquenta vezes (ROSEBOOM et al., 1996), repercute em maior quantidade da proteína e ainda em sua atividade, que pode atingir valores de dez a cem vezes superior àqueles registrados para a fase clara do dia. A elevação do mRNA da AANAT está condicionada ao início da fase escura e, portanto, ao início da liberação de noradrenalina nos adrenoceptores α_1 e β_1 dos pinealócitos, reforçando a natureza endógena dessa oscilação (RIBELAYGA et al., 1999a).

1.2.2.3 HIOMT

A transcrição do mRNA da AANAT parece ser regulada exclusivamente pela estimulação noradrenérgica em receptores do tipo β_1 , o que gera um acúmulo noturno de mRNA da enzima na glândula pineal de ratos, passível de redução pela exposição à luz durante esse período (RIBELAYGA et al., 1999a). Da mesma forma que ocorre com a expressão do gene da AANAT, o mRNA da HIOMT tem seu aumento vinculado ao início da fase escura, o que indica a dependência dessas variações em relação ao fotoperíodo (RIBELAYGA et al., 1999b).

De acordo com Ribelayga et al., 1997, 1999a e 1999b, a atividade da HIOMT exhibe uma regulação complexa, sem relação direta entre expressão e atividade e com interferência de outros fatores em seu controle diário, além da estimulação adrenérgica.

Assim, a noradrenalina atuando nos receptores α e β parece desempenhar influência apenas na manutenção a longo prazo da atividade da HIOMT em virtude de um controle que leva ao acúmulo diário de seu transcrito e de sua proteína, contribuindo para a manutenção de sua atividade basal, de forma que o aumento na transcrição durante a noite não tem reflexo imediato na atividade da enzima (RIBELAYGA et al., 1999b). Esses achados corroboram estudos mais antigos em que a atividade da HIOMT não apresentou alteração em cultura de glândulas pineais estimuladas agudamente com dibutilil AMPc (DB-AMPc), evidenciando a não-interferência imediata da via de estimulação noradrenérgica (KLEIN et al., 1970).

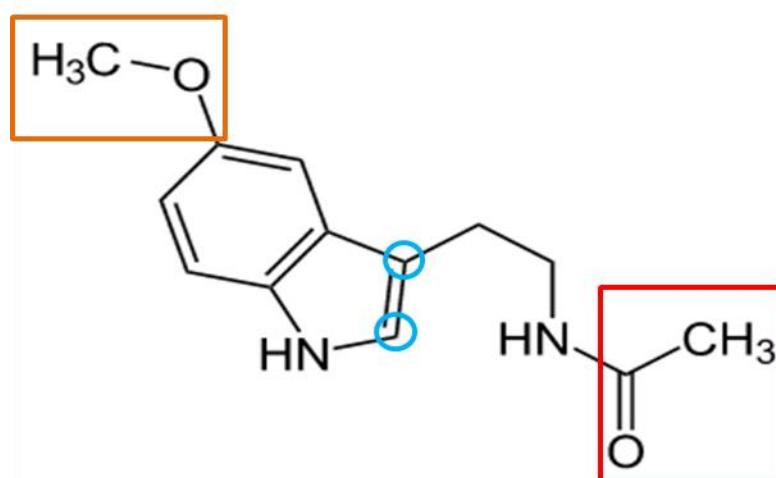
O controle agudo de sua atividade está associado a atuação de peptídeos como o neuropeptídeo Y (NPY), que eleva a atividade da HIOMT em 40% (RIBELAYGA et al., 1997). É importante destacar que estudos do mesmo grupo revelaram um discreto aumento de 30% na atividade da HIOMT in vivo durante a noite quando comparado aos valores encontrados para a fase clara do dia (RIBELAYGA et al., 1999b).

1.2.3 Secreção da melatonina e suas propriedades

O total de melatonina produzida durante a noite é prontamente secretado (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008), sendo liberado para a região perivascular glandular quando ocorre sua difusão para o sangue, onde o transporte se dá em combinação com a albumina (CARDINALI; VACAS, 1987). A concentração plasmática de pico da indolamina durante o escotoperíodo é, no rato, de aproximadamente 100 pg/mL (VOLLRATH, 1981).

Suas propriedades químicas, dadas pela presença dos grupamentos metoxi no carbono 5 e acetil ligado ao nitrogênio do grupo amina, conferem anfifilicidade a molécula, conforme evidenciado na Figura 3. Ainda, os carbonos 2 e 3 do anel pirrólico apresentam capacidade redutora, fazendo da melatonina um potente antioxidante (CIPOLLA-NETO; AFECHE, 2008).

Figura 3 - Estrutura química da melatonina.



No quadrado laranja à esquerda está destacado o grupamento metoxi e em vermelho, à direita, o grupamento acetil. Os círculos azuis indicam os carbonos 2 e 3, constituintes do anel pirrólico da melatonina e que apresentam alto poder redutor.

A melatonina desempenha diversas funções nos seres vivos, além da sinalização circadiana e do papel de antioxidante, que podem ou não serem mediadas por receptores. A interação direta da melatonina com outras moléculas dá a ela a capacidade de agir mobilizando mecanismos reparadores do DNA e regulando o processo de apoptose celular (LUCHETTI et al., 2010), além de modular diretamente a ação de diversas enzimas, regulando também o metabolismo oxidativo e o transporte de elétrons pela sua ação intra-mitocondrial (REITER et al., 2004).

1.2.4 Receptores de melatonina

Nos mamíferos estão bem caracterizados dois tipos de receptores de membrana para melatonina (DUBOCOVICH, 1995). São esses os receptores de alta afinidade MT_1 e MT_2 pertencentes à superfamília dos receptores ligados à proteína G. Mediante ligação do MT_1 com uma proteína G_i pode ocorrer uma redução na produção do AMPc (MORGAN et al., 1994) ou ainda aumento dos mensageiros resultantes da ativação da via da fosfolipase C (PLC), o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP3) quando a ligação se dá com um proteína G_q (BARRET et al., 1996). O receptor MT_2 pode estar associado a queda no conteúdo de GMPc intracelular (REPPERT et al., 1995). Os receptores de alta afinidade estão distribuídos por todo o organismo desde o sistema nervoso central, onde está presente em várias estruturas, até órgãos e tecidos da periferia (Dubocovich; Markowska, 2005).

Reppert et al., 1996 descreveram um terceiro tipo de receptor de membrana para melatonina existente em mamíferos, o MT_3 . No entanto, tal sítio de ligação é hoje considerado uma quinona redutase do tipo 2, de cuja ativação resultam efeitos antioxidantes e ainda ações no metabolismo energético (Mailliet et al., 2005; Slominski et al., 2012). É importante destacar que existem ainda outras proteínas descritas que podem se ligar a melatonina, como é o caso da calmodulina (Turjanski et al., 2004).

O receptor nuclear conhecido para a melatonina é um dos receptores órfãos da família dos receptores de ácido retinóico do tipo RZR/ROR (PARK et al., 1997).

1.3 Relação insulina e melatonina

A glândula pineal apresenta receptores para diferentes hormônios (CIPOLLANETO; AFECHE, 2008). Como consequência desse fato a produção de melatonina está sujeita não apenas ao controle neural, que envolve as descargas enviadas pelo gânglio cervical superior, mas também a modulação por hormônios, como é o caso da insulina. Alguns trabalhos tem demonstrado a influência do hormônio pancreático em etapas da via de síntese da indolamina em questão, enquanto outros demonstram a interferência da melatonina em eventos desencadeados pela insulina.

Lima et al. (1994) evidenciaram que a melatonina eleva a sensibilidade de adipócitos isolados à atuação da insulina, elevando a captação de glicose. Em 1998, outro trabalho do mesmo grupo revelou que a pinealectomia em ratos gera uma condição de resistência insulínica, evidenciada pelo teste de tolerância à glicose intravenosa (IVGTT), associada a uma redução de 40% dos transportares GLUT 4 tanto em adipócitos quanto em células musculares. Corroborando esses dados, Zanqueta et al. (2003) constataram uma queda de aproximadamente 70% nas expressões gênica e proteica de GLUT 4 no tecido adiposo branco, contribuindo para a resistência insulínica verificada para esses animais, enquanto que a reposição com melatonina se mostrou eficaz em normalizar esses parâmetros. Tais estudos reforçam a relação existente entre os hormônios pancreático e pineal.

Garcia et al. (2008) demonstraram que culturas de glândula pineal que recebiam insulina, em concentração fisiológica de 10^{-8} M, juntamente com noradrenalina a uma concentração de 10^{-6} M apresentaram a produção de melatonina potencializada. A respeito desse estudo é válido destacar que a potenciação na síntese de melatonina foi verificada em cultura padrão e de forma ainda mais expressiva em cultura sincronizada, na qual as glândulas recebiam 12 horas de estimulação com noradrenalina, seguidas de 12 horas na ausência de noradrenalina, objetivando-se mimetizar a estimulação que tal estrutura recebe in-vivo.

É importante ressaltar que tal aumento foi mais significativo ao mimetizar os períodos de estímulo da cultura, com o hormônio e neurotransmissor, ao ciclo circadiano, ou seja, 12h de ativação da glândula pineal, seguidas por 12h na ausência do estímulo na cultura sincronizada.

A potenciação da insulina na síntese de melatonina mediada por noradrenalina foi atribuída à elevação na atividade da triptofano-hidroxilase (TPH 1) assim como da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), principalmente na cultura sincronizada em prováveis eventos posteriores à transcrição. Isso é corroborado pela não alteração da expressão gênica das enzimas em questão, de acordo com Garcia et al. (2008). O estímulo à atividade da AANAT parece ser ocasionado por ação direta ou indireta da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). De tal maneira, a insulina parece atuar como potenciadora da síntese de melatonina (Garcia et al., 2010).

Por outro lado, a influência da melatonina na insulina é verificada na sincronização da secreção das ilhotas pancreáticas em relação a fase do ciclo claro-escuro ambiental frente a um estímulo com glicose (PICINATO et al., 2002a e 2002b), sendo esta fase associada ao momento de maior atividade de um organismo, que coincide com o início do escotoperíodo em roedores. Esses autores verificaram a perda no ritmo e na capacidade secretora de insulina pelo menor conteúdo de PKA pancreática, assim como alteração da oxidação de glicose pelas células β -pancreáticas em animais com ausência crônica da pineal.

Além da influência na secreção insulínica, a melatonina ainda aumenta a sensibilidade dos tecidos periféricos e no sistema nervoso central à insulina ao promover a ativação dos seus receptores (ANHÊ et al., 2004; PICINATO et al., 2008) e aumentar a síntese de GLUT4 em alguns tecidos (Seraphim et al, 1997).

1.4 Diabetes mellitus

De acordo com a International Diabetes Federation (IDF), em 2012, aproximadamente 366 milhões de pessoas na idade adulta eram consideradas diabéticas, em uma estimativa obtida a partir das sete regiões mundiais que são monitoradas pela organização. As previsões apontam para valores próximos de 552 milhões de diabéticos no mundo em 2030, o que equivale dizer que uma em cada dez pessoas terá diabetes mellitus na data em questão. Ainda nesse aspecto, é importante destacar algumas estimativas que indicam aproximadamente 183 milhões de indivíduos que apresentam a condição e não estão diagnosticados. No Brasil, em 2012, a IDF identificou aproximadamente 13.4 milhões de pessoas como

portadores de diabetes, sendo o quarto país com maior número de indivíduos afetados, atrás somente da China, Índia e Estados Unidos da América.

Segunda a American Diabetes Association (ADA), o diabetes mellitus (DM) é um dos fatores componentes da síndrome metabólica, classificando-se em: DM do tipo I, também conhecida como insulino-dependente ou ainda juvenil, em virtude da faixa etária em que a condição costuma se manifestar e DM do tipo II, considerada tardia por incidir predominantemente na população adulta. Essa variedade está associada a baixa produção de insulina ou ação ineficaz desse hormônio. A hiperglicemia é um fator comum às duas manifestações da síndrome.

A causa primordial responsável pelo diabetes mellitus tipo I, conforme evidenciam a IDF e a ADA, é a não produção de insulina pelas células β do pâncreas, resultante de uma ação auto-imune. Do total de pacientes diabéticos, apenas 5% são acometidos pelo DM tipo I, sendo a maioria composta por crianças e adolescentes. O tratamento inadequado ou inexistente dessa condição pode conduzir a várias complicações, como cegueira, falência renal, doenças cardiovasculares, neuropatia e até mesmo amputação de membros.

A insulina humana recombinante, substituinte daquela de origem animal, viabilizou o ajuste das doses hormonais à concentração de glicose no sangue, variável ao longo do dia em função da ingestão alimentar (MARZZOCO; TORRES, 2007) e caracteriza a principal forma de tratamento de indivíduos acometidos pelo DM tipo I.

Atualmente, existem variadas abordagens como o uso de bombas de insulina e de medicamentos coadjuvantes, como a metformina, no tratamento de pacientes dependentes de insulina (DANEMAN, 2006) além da já citada reposição hormonal que se realiza tradicionalmente por meio de injeções diárias. Entretanto, é necessário ressaltar que existem fatores que tornam esse processo menos eficaz que o desejado, como é o caso da ritimicidade na secreção de insulina, conforme verificada por Picinato et al. (2002), cuja flutuação nem sempre é passível de se reproduzir em diabéticos que se utilizam apenas da terapia de reposição. Para maior elucidação dessa questão, um estudo brasileiro recente revelou que apenas 7,3% e 5,1% do total de 1.358 pacientes acometidos por diabetes mellitus tipo I ou tipo II, respectivamente, se enquadram nos padrões considerados ótimos para controle de pressão arterial, glicemia e lipídemia (BRAGA et al., 2013).

De tal maneira, o tratamento para pacientes com diabetes tipo I envolve ainda o regime alimentar e a atividade física como fatores que auxiliam no controle da hiperglicemia e na melhoria da qualidade de vida do paciente diabético (DANEMAN, 2006).

1.5 Melatonina e diabetes mellitus

Processos metabólicos e ritmos biológicos exibem uma relação de interdependência considerável. Enquanto os primeiros são adaptados aos diferentes desafios inerentes aos momentos de claro e escuro do ciclo circadiano e ainda em relação às variações sazonais, como se observa pela relação entre as fases de vigília/alimentação e sono/jejum, os ritmos biológicos sofrem influência direta de possíveis alterações do metabolismo de um organismo (GREEN; TAKAHASHI; BASS, 2008). Essa relação pode também ser explorada quando analisamos o comprometimento da organização circadiana quanto a produção e secreção hormonais após ratos obesos terem sido submetidos a uma dieta hipercalórica, nos quais verifica-se uma alteração no ritmo diário da produção de certos hormônios, além de aumento na produção de corticosterona plasmática e de queda na melatonina pineal, aspectos bastante semelhantes aos evidenciados para mulheres com síndrome metabólica, ou ainda o prejuízo em parâmetros associados a qualidade do sono em indivíduos diabéticos tipo I sem controle glicêmico apropriado (BARONE, 2011; CANO et al., 2008; CORBALÁN-TUTAU et al., 2012).

Dessa forma, modificações envolvendo a síntese e secreção de melatonina, um dos grandes componentes do sistema de sinalização da ritmicidade circadiana dos seres vivos, em função de alterações do metabolismo energético, como é o caso do diabetes mellitus, podem ser observadas com naturalidade. Ainda, é importante ressaltar que tais ocorrências implicam também em uma série de mudanças que vão desde o padrão comportamental de um indivíduo até as bases moleculares de controle do sistema de relógio de um organismo, abrangendo alças de transcrição e tradução gênicas, modificação de atividade enzimática e secreção hormonal (GREEN; TAKAHASHI; BASS, 2008).

No campo da ação da melatonina no diabetes, encontramos dados variados na literatura mostrando que a melatonina reduziu a hiperglicemia e a hiperlipidemia em ratas diabéticas induzidas ao quadro por injeção de estreptozotocina (STZ)

(MONTILLA et al., 1998). Outros registros mostram que não houve diminuição da hiperglicemia em ratos diabéticos por STZ e posteriormente tratados intraperitonealmente com melatonina (VURAL et al., 2001), embora outro estudo tenha mostrado que ratos diabéticos por STZ pré-tratados com melatonina apresentaram níveis hiperglicêmicos mais baixos do que os mesmos animais não-tratados (ABDEL-WAHAB; ABD-ALLAH, 2000).

Dados recentes revelaram que ratos diabéticos obesos da linhagem ZDF (Zucker Diabetic Fatty) que receberam melatonina em água pelo período de seis semanas apresentaram redução na hiperglicemia de jejum e na insulinemia, além de normalizar outros parâmetros como a hiperleptinemia, a quantidade de ácidos graxos livres e a hipoadiponectinemia quando comparados a outros animais de mesma idade e linhagem sem suplementação (AGIL et al., 2012).

Os primeiros registros na literatura analisando os efeitos do diabetes experimental sobre a síntese e secreção de melatonina mostraram, tanto em ratos quanto em hamsters (CHAMPNEY et al., 1983), que o diabetes quimicamente induzido por estreptozotocina provoca redução na síntese e nos níveis circulantes de melatonina. Essa diminuição na produção de melatonina pela glândula pineal seria principalmente resultante de uma redução da atividade da HIOMT.

Por outro lado, outros dados apontam para a não interferência da insulina no metabolismo da glândula pineal e, portanto, na concentração de melatonina, conforme explica Champney et al. (1986).

Entretanto, foi evidenciado que no hamster a insulina aumenta a atividade da AANAT e não da HIOMT. Injeções com insulina tiveram como efeito o aumento da atividade enzimática da AANAT, assim como da concentração sérica de melatonina. (LYNCH et al., 1973, apud STEBELOVÁ et al., 2007). No mesmo ano, O'Brien et al. (1986) mostraram que pacientes diabéticos com evidência de neuropatia autonômica não apresentam o aumento noturno fisiológico da melatonina plasmática, que encontra-se também alterado em pacientes sem neuropatia aparente, provavelmente caracterizando um estado subclínico de denervação simpática, de acordo com os autores.

Dados mais recentes também apresentam certa controvérsia. Assim, Herichová et al. (2005) não encontraram diminuição na síntese pineal de melatonina em ratos Wistar após 7 dias de indução de diabetes com uma única dose de STZ (100 mg/kg). O mesmo grupo mostrou, em contrapartida, diminuição da síntese

pineal da indolamina, com níveis normais de melatonina plasmática. Essa contradição com os dados anteriores foi explicada pelos autores como sendo relacionada ao desenvolvimento do quadro diabético. Esses autores evidenciaram também níveis diminuídos no pâncreas, rins e duodeno, em animais diabéticos 17 dias pós-indução com estreptozotocina (65 mg/kg) (STEBELOVÁ et al., 2007). Tal grupo ainda apresenta a associação entre a dessincronização dos ritmos circadianos e a condição de saúde de diabéticos com suas alterações metabólicas, o que pode ser explicado por falhas entre relógio central (núcleo supraquiasmático) e o periférico.

O trabalho de Tutunco et al. (2005) mostrou que pacientes diabéticos com neuropatia autonômica cardíaca apresentaram níveis plasmáticos de melatonina diminuídos em relação à pacientes controles e a diabéticos sem neuropatia. Estudo em pacientes jovens adultos com síndrome metabólica não mostrou diferença nos níveis plasmáticos de melatonina, nem no perfil da melatonina, quando comparados a jovens adultos controles (ROBEVA et al., 2006). Um trabalho recente avaliou uma queda na produção de melatonina em homens obesos diabéticos tipo II, achado possivelmente correlacionado com a baixa sensibilidade à insulina encontrada nesses pacientes quando comparados aos seus controles, homens obesos e não diabéticos (MANTELE et al., 2012).

Peschke et al. (2006) mostraram que ratos Goto Kakizaki espontaneamente diabéticos tipo 2 apresentam diminuição de melatonina plasmática e da atividade da AANAT, associada a níveis elevados tanto de glicemia quanto de insulinemia, quando comparados a ratos Wistar. O mesmo trabalho mostrou ainda que os níveis plasmáticos de melatonina em pacientes diabéticos tipo 2 estão diminuídos, em associação a níveis elevados de glicemia e a níveis não significativamente aumentados de insulinemia. O mesmo grupo (PESCHKE et al., 2008) encontrou elevação na melatonina plasmática de animais diabéticos tipo 1 tanto com 12 quanto com 51 semanas de idade, 6 semanas pós-indução com STZ, além de também observarem aumento no RNAm da AANAT, do receptor de insulina e do receptor β 1-adrenérgico em animais de ambas idades, e aumento do RNAm para HIOMT nos animais de 12 semanas. Estudos recentes de Peschke et al., 2012 encontraram o aumento no nível de catecolaminas como possível causa do aumento na melatonina atribuído ao DM tipo I em ratos Wistar diabéticos por STZ e de uma linhagem espontaneamente diabética tipo I conhecida como LEW.1AR-iddm, sendo que o

mesmo raciocínio poderia ser aplicada ao verificado para a síntese da indolamina em organismos com DM tipo II. Nesse estudo, a administração de insulina aos ratos LEW.1AR-iddm foi capaz de reverter o aumento diurno verificado para a adrenalina e noradrenalina e conseqüentemente da síntese de melatonina.

Estudos do nosso grupo (AMARAL, 2009) se contrapõem aos achados citados anteriormente. Evidências sobre a redução na síntese de melatonina em ratos Wistar foram verificadas após 3 e 15 dias da indução do quadro por STZ e ainda em animais submetidos a microdiálise, em que foi observado o decurso temporal do padrão de síntese de melatonina em momentos anteriores e posteriores a instalação do diabetes em um mesmo indivíduo. Esse mesmo estudo revelou ainda alguns mecanismos associados a produção pineal de melatonina e que se mostraram alterados no organismo diabético. Dentre eles, destacam-se a queda na no conteúdo de AMPc da glândula pineal e na atividade da AANAT. Ainda, foi constatada redução no conteúdo proteico da AANAT e modificações na ritmicidade da expressão gênica do receptor β_1 e das enzimas TPH1 e HIOMT.

Ainda nesse contexto é importante ressaltar que o diabetes mellitus quimicamente induzido por STZ e efeitos da hiperglicemia em cultura não estão relacionados a danos à integridade do gânglio cervical superior, importante estrutura na via de controle neural associada a produção de melatonina (Schmidt et al., 2001; Semra et al., 2004). A condição da glândula pineal em ratos com DM tipo I foi avaliada por Tsai et al., 2008, os quais observaram uma redução no volume glandular relacionado a queda do diâmetro nuclear dos pinealócitos a partir da quarta semana da instalação do quadro diabético. É fundamental destacar que não foram registradas quedas na população celular da glândula ao longo do período analisado de 6 meses na condição diabética, aspecto acompanhado por um aumento no conteúdo proteico de serotonina.

2 CONCLUSÕES

O presente trabalho contribui para o esclarecimento a respeito do que ocorre com a síntese de melatonina em modelos animais de ratos diabéticos tipo I tratados com insulina.

Foi possível constatar que a redução de melatonina pineal nesses organismos está associada à queda do conteúdo proteico e da atividade da enzima passo limitante da via de síntese da indolamina pineal, a AANAT. A esses aspectos soma-se a queda no conteúdo do segundo mensageiro de maior importância para a síntese de melatonina, o AMPc, nos animais diabéticos. O tratamento com insulina, duas vezes ao dia, foi capaz de regularizar os parâmetros citados, cabendo destacar que a proteína da AANAT apresenta uma reversão apenas parcial em seu conteúdo.

Ainda, foi possível constatar que a alteração no organismo diabético tipo I de maior relevância para o prejuízo que se observa na síntese de melatonina é a hiperglicemia, sendo que a reposição com insulina parece levar a normalização da produção hormonal pela glândula pineal através do controle glicêmico. Um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse processo é o funcionamento da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ na glândula pineal, prejudicado em animais diabéticos e com tendência ao reestabelecimento em diabéticos tratados. A hiperglicemia parece não interferir com a expressão gênica na glândula pineal.

Com isso, destaca-se mais uma vez a importância do controle glicêmico em organismos diabéticos, com benefícios que se estendem ao funcionamento adequado da glândula pineal e, conseqüentemente, à produção regular de melatonina, que por sua vez se reflete na coordenação de variados processos fisiológicos, contribuindo para a homeostase orgânica e bem estar do indivíduo.

No entanto, é de conhecimento geral que semelhante controle não é alcançado apenas pela reposição hormonal, estando os indivíduos acometidos pelo quadro diabético sujeitos às flutuações glicêmicas ao longo do dia nem sempre passíveis de serem contornadas com total eficácia pela utilização de insulina. Nesse contexto, aventa-se o uso, mediante orientação médica adequada, da melatonina como possível coadjuvante no tratamento da condição diabética, podendo também servir como forma de prevenção aos indivíduos que possuem predisposição ao desenvolvimento do diabetes.

REFERÊNCIAS*

ABDEL-WAHAB, M. H.; ABD-ALLAH, A. R. A. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice. **Pharmacol. Res.**, v. 41, n. 5, p. 533-537, 2000.

AGIL, A.; ROSADO, I.; RUIZ, R.; FIGUEROA, A.; ZEN, N.; FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, G. Melatonin improves glucose homeostasis in Young Zucker diabetic fatty rats. **J. Pineal Res.**, v. 52, p. 203-210, 2012.

AMARAL, F. G. **Perfil diário e os mecanismos de produção de melatonina pela glândula pineal de ratos diabéticos por estreptozotocina**. 2009. 181 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. **Diabetes basics**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/?loc=GlobalNavDB>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

ARENDDT, J. **Melatonin and the mammalian pineal gland**. London: Chapman & Hill, 1995.

BARASSIN, S.; SABOUREAU, M.; KALSBECK, A.; BOTHOREL, B.; VIVEN-ROELS, B.; MALAN, A.; BUJIS, R. M.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; PÉVET, P. Interindividual differences in the pattern of melatonin secretion of the Wistar rat. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 193-201, 1999.

BARASSIN, S.; KALSBECK, A.; SABOUREAU, B.; VIVEN-ROELS, B.; MALAN, A.; BUJIS, R. M.; PÉVET, P. Potentiating effect of vasopressin on melatonin secretion as determined by trans-pineal microdialysis in the rat. **J. Neuroendocrinol.**, v. 12, p. 61-68, 2000.

BARRETT, P.; MacLEAN, A.; DAVIDSON, G.; MORGAN, P. J. Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: Evidence for a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism expression. **Mol. Endocrinol.**, v. 10, p. 892-902, 1996.

BARONE, M. T. U. *Ciclo vigília/sono em portadores de diabetes mellitus tipo I*. 2011. 26f. Tese (Doutorado em Ciências – Fisiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

BRAGA, J. R.; AVEZUM, A.; FERREIRA, S. R. G.; FORTI, A. Management of diabetes mellitus and associated cardiovascular risk factors in Brazil – the Brazilian study on the practice of diabetes care. **Diabetol. Metab. Syndr.**, v. 5, p. 1-15, 2013.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D.; COLLIN, F. Melatonin: action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology**, v. 278, p. 55-67, 2010.

* De acordo com:

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

CALDAS, J. G.; DOMINIQUE, D.; LEDERMAN, H.; CARLIER, R. Estudo por ressonância magnética da região da pineal: pineal normal e cistos simples. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, v. 56, n. 2, p. 237-244, 1998.

CANO, P.; JIMENÉS-ORTEGA, V.; LARRAD, A.; TOSO, C. F. R.; CARDINALI, D. P.; ESQUIFINO, A. I. Effect of a high-fat diet on 24-h pattern of circulating levels of prolactin, luteinizing hormone, testosterone, corticosterone, thyroid-stimulating hormone and glucose, and pineal melatonin content, in rats. **Endocrinology**, v. 33, p. 118-125, 2008.

CARDINALI, D. P.; VACAS, M. I. Cellular and molecular mechanisms controlling melatonin release by mammalian pineal glands. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 7, p. 323-337, 1987.

CHAMPNEY, T. H.; BRAINARD, G. C.; RICHARDSON, B. A.; REITER, R. J. Experimentally-induced diabetes reduces nocturnal pineal melatonin content in the Syrian hamster. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76, p. 199-201, 1983.

CHAMPNEY, T. H.; HOLTORF, A. P.; CRAFT, C. M.; REITER, R. J. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin injections. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 83, p. 391-395, 1986.

CIPOLLA-NETO, J.; RECINE, E. G.; MENNA-BARRETO, L. S.; MARQUES, N.; AFECHE, S.G.; SCHOTT, C.; FORTUNATO, G.; SOTHERN, R. B.; HALBERG, F. Perinatal malnutrition, suprachiasmatic nuclear lesioning and circadian-ultradian aspects of spontaneous behaviour of albino rats. **Prog. Clin. Biol. Res.** v.227, p. 473-489, 1987.

CIPOLLA-NETO, J.; SKORUPA, A.L.; RIBEIRO-BARBOSA, E. R.; BARTOL, I.; MOTA, S. R.; AFECHE, S. C.; DELAGRANGE, P.; GUARDIOLA-LEMAITRE, B.; CANTERAS, N. S. The role of the retrochiasmatic area in the control of pineal metabolism. **Neuroendocrinology**, v. 69, n. 2, p. 97-104, 1999.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 980-990.

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, 1971. p. 79-125.

CORBALÁN-TUTAU, D.; MADRID, J. A.; NICOLÁS, F.; GARAULET, M. Daily profile in two circadian markers "melatonin and cortisol" and associations with metabolic syndrome components. **Physiol. Behav.**, 2012. In press.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 367, p. 847-858, 2006.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin receptors: Are there multiple subtypes? **TiPS**, v. 16, p. 50-56. 1995.

DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 101-110, 2005.

EKSTRÖM, P.; MEISSL, H. Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 358, p. 1679-1700, 2003.

GARCIA, R. A. P.; AFECHE, 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.

GARCIA, R. A. P.; MARÇAL, A. C.; ANDRADE, J. S.; CARMO-BUONFIGLIO, D.; AMARAL, F. G.; AFECHE, S. C.; CIPOLLA-NETO, J.; CARVALHO, C. R. O. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. **Life Sci.**, v. 87, p. 169-174, 2010.

GREEN, C. B.; TAKAHASHI, J. S.; BASS, J. The Meter of Metabolism. **Cell**, v. 134, p. 728-742, 2008.

HALL, J. E. Insulina, glucagon e Diabetes mellitus. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 987-999.

HERICHOVÁ, I.; ZEMAN, M.; STEBELOVÁ, K.; RAVINGEROVÁ, T. Effect of streptozotocin-induced diabetes on daily expression of per2 and dbp in the heart and liver and melatonin rhythm in the pineal gland of Wistar rat. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 270, p. 223-229, 2005.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; SRINIVASAN, V.; SPENCE, D. W.; BROWN, G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin: A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p. 350-384, 2011.

HUANG, Z.; LIU, T.; CHATTORAJ, A.; AHMED, S.; WANG, M. M.; DENG, J.; SUN, X.; BORJIGIN, J. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. **J. Pineal Res.**, v. 45, p. 506-514, 2008.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Diabetes atlas**. 5. ed. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/news/fifth-edition-release>>. Acesso em: 25 jun. 2012.

KIM, J-SO; BAILEY, M. J.; HO, A. K.; MOLLER, M.; GAILDRAT, P.; KLEIN, D. C. Daily rhythm in pineal phosphodiesterase (PDE) activity reflects adrenergic/3'-5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate induction of the PDE4B2 variant. **Endocrinology**, v. 148, n. 4, p. 1475-1485, 2007.

KLEIN, D. C.; BERG, G. R.; WELLER, J. Melatonin synthesis: adenosine 3',5'-monophosphate and norepinephrine stimulate N-acetyltransferase. **Science**, v. 168, n. 934, p. 979-980, 1970.

KLEIN, D. C.; WELLER, J. L. Indole metabolism in the pineal gland: a circadian rhythm in N-acetyltransferase. **Science**, v. 169, n. 950, p. 1093-1095, 1970.

KLEIN, D. C.; BUDA, M. J.; KAPOOR, C. L.; KRISHNA, G. Pineal serotonin N-acetyltransferase activity: abrupt decrease in adenosine 3',5'-monophosphate may be signal for "Turnoff". **Science**, v. 199, p. 309-311, 1978.

KLEIN, D. C.; SUGDEN, D.; WELLER, J. L. Postsynaptic α -adrenergic receptors potentiate the β -adrenergic stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 80, p. 599-603, 1983.

KOCH, M.; MAUHIN, V.; STEHLE, J. H.; SCHOMERUS, C.; KORF, H. W. Desphosphorylation of pCREB by protein serine/threonine phosphatase is involved in inactivation of NAT gene transcription in rat pineal gland. **J. Neurochem.**, v. 85, p. 170-179, 2003.

KORF, H. W. Evolution of melatonin-producing pinealocytes. In: OLCESE, J. **Melatonin After Four Decades**. New York: Kluwer/Plenum, 2000. p. 17–29.

KORKMAZ, A.; MA, S.; TOPAL, T.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Glucose: A vital toxin and the potential utility of melatonin in protecting against the diabetic state. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 349, p. 75-82, 2012.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 80, p. 2587, 1958.

LIMA, F. B.; MATSUSHITA, D. H.; HELL, N. S.; DOLNIKOFF, M. S.; OKAMOTO, M. M.; CIPOLLA-NETO, J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of the day and melatonin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, p. 995-1000, 1994.

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, 1998.

LIMA, L. M. B.; REIS, L. C.; LIMA, M. A. Influence of the pineal gland on the physiology, morphometry and morphology of pancreatic islets in rats. **Rev. Bras. Biol.**, São Carlos, v. 61, n. 2, p. 333-340, 2001.

LUCHETTI, F.; CANONICO, B.; BETTI, M.; ARCANGELETTI, M.; PILOLLI, F.; PIRODDI, M.; CANESI, L.; PAPA, S.; GALLI, F. Melatonin signaling and cell protection function. **The FASEB Journal**, v. 24, p. 3603-3624, 2010.

MAILLET, F.; FERRY, G.; VELLA, F.; BERGER, S.; COGÉ, F.; CHOMARAT, P.; MALLET, C.; GUÉNIN, S. P.; GUILLAUMET, G.; VIAUD-MASSAUD, M. C.; YOUS, S.; DELAGRANGE, P.; BOUTIN, J. A. Characterization of the melatonergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. **Bioche. Pharmacol.**, v. 71, p. 74-88, 2005.

MANTELE, S.; OTWAY, D. T.; MIDDLETON, D.; BRETSCHEIDER, S.; WRIGHT, J.; ROBERTSON, M. D.; SKENE, D. J.; JOHNSTON, J. D. Daily plasma rhythms of plasma melatonin, but not plasma leptin or leptin mRNA, vary between lean, obese and type 2 diabetic men. **PLoS One**, v. 7, p. 1-8, 2012.

MARONDE, E. E.; WICHT, H.; TASKÉN, K.; GENIESSER, H. G.; DEGHANI, F.; OLCESE, J.; KOLF, H. W. CREB phosphorylation and melatonin biosynthesis in the rat pineal: involvement of cyclic AMP dependent protein kinase Type II. **J. Pineal Res.**, v. 27, p. 170-182, 1999.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Regulação integrada do metabolismo. In:_____. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 304-314.

MONTILLA, P. L.; VARGAS, J. F.; TÚNEZ, I. F.; de AGUEDA, M. C. M.; VALDELVIRA, M. E. D.; CABRERA, E. S. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 25, p. 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.

O'BRIEN, I.A.; LEWIN, I. G.; O'HARE, J. P. et al. Abnormal circadian rhythm of melatonin in diabetic autonomic neuropathy. **Clin. Endocrinol.**, v. 24, p. 359–364, 1986.

PARFITT, A.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Beta adrenergic-blockers decrease adrenergically stimulated N-acetyltransferase activity in pineal glands in organ culture. **Neuropharmacology**, v. 15, p. 353-358, 1976.

PARK, H. T.; KIM, Y. J.; YOON, S.; KIM, J. B.; KIM, J. J. Distributional characteristics of the mRNA for retinoid Z receptor β (RZR β), a putative nuclear melatonin receptor, in the rat brain and spinal cord. **Brain Res.**, v. 747, p. 332-337. 1997.

PESCHKE, E.; FRESE, T.; CHANKIEWITZ, E.; PESCHKE, D.; PREISS, U.; SCHNEYER, U.; SPESSERT, R.; MÜHLBAUER, E. Diabetic Goto-Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. **J. Pineal Res.**, v. 40, p. 135-143, 2006.

PESCHKE, E.; WOLGAST, S.; BAZWINSKY, I.; PÖNICK, K.; MÜHLBAUER, E. Increased melatonin synthesis in pineal glands of rats in streptozotocin induced type 1 diabetes. **J. Pineal Res.**, v. 45, p. 439–448, 2008.

PESCHKE, E.; HOFMANN, K.; PÖNICK, K.; WEDEKING, D., MÜHLBAUER, E. Catecholamines are the key for explaining the biological relevance of insulin-melatonin antagonisms in type 1 and type 2 diabetes. **J. Pineal. Res.** v. 52, p.389-396, 2012.

PICINATO, M. C.; HABER, E. P.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; CARVALHO, C.R.O.; CARPINELLI, A.R. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 156-160, 2002a.

PICINATO, M. C.; HABER, E. P.; CARPINELLI, A. R.; CIPOLLA-NETO, J. Daily rhythm of glucose-induced insulin secretion by isolated islets from intact and pinealectomized rat. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 172-177, 2002b.

PICINATO, M. C.; HIRATA, A. E.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; 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.

RIOS, E. R. V.; VENÂNCIO, E. T.; ROCHA, N. F. M.; WOODS, D. J.; VASCONCELOS, S.; MACEDO, D.; SOUSA, C. F.; FONTELES, M. M. F. Melatonin: Pharmacological aspects and clinical trends. **Int. J. Neurosci.**, v. 120, p. 583-590, 2010

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

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GITTO, E.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C.; LEON, J.; MANCHESTER, L. C.; VIJAYALAXMI; KILIC, E.; KILIC, U. Pharmacological utility of melatonin in reducing oxidative cellular and molecular damage. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p. 159-170, 2004.

REPPERT, S. M.; GODSON, C.; MAHLE, C. D.; WEAVER, D. R.; SLAUGENHAUPT, S. A.; GUSELLA, J. F. Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: The Mel1b melatonin receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 8734-38, 1995.

RIBELAYGA, C.; PÉVET, P.; SIMMONEAUX, V. Adrenergic and peptidergic regulations of hydroxyindole-O-methyltransferase activity in rat pineal gland. **Brain Res.**, v. 777, p. 247-250, 1997.

RIBELAYGA, C.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PEVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photoneural regulation of rat pineal hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) messenger ribonucleic acid expression: an analysis of its complex relationship with HIOMT activity. **Endocrinology**, v. 140, p. 1375-1384, 1999a.

RIBELAYGA, C.; GARIDOU, M-L.; MALAN, A.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photoperiodic control of the rat pineal AANAT and HIOMT gene expression and its effect on melatonin synthesis. **J. Biol. Rhythms**, v. 14, n. 2, p. 105-115, 1999b.

ROBEVA, R.; KIRILOV, G.; TOMOVA, A.; KUMANOV, P. Low testosterone levels and unimpaired melatonin secretion in young males with metabolic syndrome. **Andrologia**, v. 38 p. 216–220, 2006.

ROSEBOOM, P. H.; COON, S. L.; BALER, R.; McCUNE, S. K.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Melatonin synthesis: analysis of the more than 150-fold nocturnal increase in serotonin N-acetyltransferase messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland. **Endocrinology**, v. 137, n. 7, p. 3033-3044, 1996.

SERAPHIM, P. M.; BARTOL, I.; CIPOLLA-NETO, J.; MACHADO, U. F. Quantification of GLUT 4 transporters in insulin- sensitive tissues from pinealectomized rats. In: WEBB, S.; PUIG-DOMINGO, M.; MOLLER, M.; PÉVET, P. **Pineal Uptade: from molecular biology to clinical implications**. New York: PJD Publications Limited, 1997. p. 99-106.

SEMRA, Y. K.; SMITH, N. C. E.; LINCOLN, J. Comparative effects of high glucose on different adult sympathetic neurons in culture. **Neuroreport**, v. 15, p. 2321-2325, 2004.

SCHMIDT, R. E. Neuronal preservation in the sympathetic ganglia of rats with chronic streptozotocin-induced diabetes. **Brain. Res.**, v. 921, p. 256-259, 2001.

SHI, Q.; SENG, J.; DONG, Y.; XU, K. Y. Concurrent impairment of (Na⁺+K⁺)-ATPase activity in multi-organ of type-1 diabetic NOD mice. **J. Diabet. Complications**. Dezembro/2012. IN PRESS.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p. 325-395, 2003.

SKORUPA, A. L.; GARIDOU, M. L.; BOTHOREL, B.; SABOUREAU, M.; PÉVET, P. ; CIPOLLA-NETO, J.; SIMONNEAUX, V. Pineal melatonin synthesis and release are not altered throughout the estrous cycle in female rats. **J. Pineal Res.**, v. 34, p. 53–59, 2003.

SLOMINSKI, R. M.; REITER, R. J.; SCHLABRITZ-LOUTSEVITCH, N.; OSTROM, R. S.; SLOMINSKI, A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 2, p. 156-166, 2012.

STEBELOVÁ, K.; HERICHOVÁ, I.; ZEMAN, M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. **Neuro Endocrinol. Lett.**, v. 28, n. 2, p. 159-165, 2007.

SUDNOKOVICH, E. J.; MAKSIMCHIK, Y. Z.; ZABRODSKAYA, S. V.; KUBYSHIN, V. L.; LAPSHINA, E. A.; BRYSZEWSKA, M.; REITER, R. J.; ZAVODNIK, I. B. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 569, p. 180-187, 2007.

SUGDEN, D.; VANECEK, J.; KLEIN, D. C.; THOMAS, T. P.; ANDERSON, W. B. Activation of protein kinase C potentiates isoprenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat pinealocytes. **Nature**, v. 314, p. 359-361, 1985.

SUGDEN, A. L.; SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. Essential role of calcium influx in the adrenergic regulation of cAMP and cGMP in rat pinealocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 11608-11612, 1986.

SUGDEN, A. L.; SUGDEN, D.; KLEIN, D. C. α 1-Adrenoceptor activation elevates cytosolic calcium in rat pinealocytes by increasing net influx. **J. Biol. Chem.**, v. 262, p. 741-745, 1987.

TZAVARA, E. T.; POUILLE, Y.; DEFER, N.; HANOUNE, J. Diurnal variation of the adenylyl cyclase type 1 in the rat pineal gland. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 11208-11212, 1996.

TURJANSKI, A. G.; ESTRIN, D. A.; ROSENSTEIN, R. E.; MCCORMICK, J. E.; MARTIN, S. R.; PASTORE, A. BIEKOFISKY, R. R.; MARTORANA, V. NMR and molecular dynamics studies of the interaction of melatonin with calmodulin. **Prot. Sci.**, v. 13, p. 2925-2938, 2004.

TUTUNCU, N. B.; BATUR, M. K.; YILDIRIR, A.; TUTUNCU, T.; DEGER, A.; KORAY, Z.; ERBAS, B.; KABAKCI, G.; AKSOYEK, S.; ERBAS, T. Melatonin levels decrease in type 2 diabetic patients with cardiac autonomic neuropathy. **J. Pineal Res.**, v. 39, n. 1, p. 43-49, 2005.

VANECEK, J.; SUGDEN, D.; WELLER, J. L.; KLEIN, D. C. Atypical synergistic α 1- and β -adrenergic regulation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in rat pinealocytes. **Endocrinology**, v. 116, p. 2167-2173, 1985.

VER, A.; SZANTO, I.; BANYASZ T.; CSERMELY P.; VEGH, E.; SOMOGYI J. Changes in the expression of Na⁺/K⁺ ATPase isoenzymes in the left ventricle of diabetic rat hearts: effect of insulin treatment. **Diabetologia**, v. 40, p. 1255-1262, 1997.

VOLLRATH, L. The pineal organ. In: OKSCHE, A.; VOLLRATH, L. **Handbuch Der mikroskopischen anatomie des menschen**. Berlin: Springer, 1981. v. 6/7.

VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, S. O.; AKSOY, N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. **J. Pineal Res.**, v. 31, n. 3, p. 193-198, 2001.

YU, L.; SCHAAD, N. C.; KLEIN, D. C. Calcium potentiates cyclic AMP stimulation of pineal arylalkylamine N-acetyltransferase. **J. Neurochem.**, v. 60, p. 1436-1443, 1993.