UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIELA MENESES SANTOS

AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA GLÂNDULA PINEAL E A MODULAÇÃO DOS GENES RELÓGIO EM RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DEXAMETASONA

ARACAJU
2013

DANIELA MENESES SANTOS

AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA GLÂNDULA PINEAL E A MODULAÇÃO DOS GENES RELÓGIO EM RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DEXAMETASONA

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto

ARACAJU
2013

DANIELA MENESES SANTOS

AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA GLÂNDULA PINEAL E A MODULAÇÃO DOS GENES RELÓGIO EM RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DEXAMETASONA

Aprovada em ___/___/_____

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

_____

Orientador: Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto
Universidade Federal de Sergipe – Orientador

_____

1º Examinador: Prof. Dr. José Cipolla Neto
Universidade de São Paulo – ICB/USP

_____

2º Examinador: Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal
Universidade Federal de Sergipe – DMO/UFS

PARECER

_____

_____

_____

_____

_____

_____

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Santos, Daniela Meneses
S237a Avaliação da funcionalidade da glândula pineal e a modulação dos genes relógio em ratos tratados cronicamente com dexametasona / Daniela Meneses Santos; orientador Emerson Ticona Fioretto. – Aracaju, 2013.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2013.

1. Fisiologia endócrina – Pesquisa. 2. Genes relógio. 3. Glândula pineal. 4. Melatonina. I. Fioretto, Emerson Ticona, orient. II. Título.

CDU 612.459-047.37

"Determinação, coragem e autoconfiança são* fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de *orgulho".

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Neste momento de finalização, agradeço a todos que estiveram ao meu lado ao longo desta caminhada, doando conhecimento, sabedoria e discernimento para seguir em frente com humildade e gratidão.

Primeiramente agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, iluminando-me e auxiliando em minhas decisões.

Aos meus tios Lurdes e João por terem acreditado e fornecido condições para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida, MUITO OBRIGADA!

Aos meus primos- irmãos André e Andreia, pela convivência diária, preocupação e zelo.

As minhas amigas Elaine, Raquel, Gabi pelas risadas juntas, ombro amigo e conversas confortantes. Valeu pela força!

Aos colegas queridos do laboratório, Douglas, Larissa, Edmário, Pedro, Rafaela e Renan pela ajuda com os animais durante os experimentos.

Aos funcionários do biotério central da UFS, Galego e Osvaldo.

Agradeço ao Prof. Dr. Cipolla-Neto, por ter aberto as portas do seu laboratório e ter permitido a realização dos experimentos que foram essenciais para a concretização deste projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Ângelo Rafael Carpinelli por permitir a utilização do seu laboratório para os ensaios imunoenzimáticos.

Agradeço a Prof. Drª. Solange C. Afeche por permitir a realização da atividade da AANAT em seu laboratório.

Agradeço a Drª. Daniella do Carmo Buonfligio por ter auxiliado na quantificação da expressão gênica no laboratório de neurobiologia. Ademais, por ter compartilhado seu tempo e conhecimento. MUITO OBRIGADA!

À Ângela Lobo e Fernanda Amaral, por terem auxiliado ao longo dos ensaios.

As técnicas do Departamento de fisiologia USP/ICB, Julieta Falcão e Marlene Rocha pelo acolhimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson Ticona Fioretto. Obrigada pela confiança.

Ao Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal por sua paciência, compreensão e disposição em co-orientar-me, estando ao meu lado diariamente ao longo destes últimos anos. Muito obrigada pela confiança.

Obrigada a todos!

RESUMO

SANTOS D.M. **AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DA GLÂNDULA PINEAL E A MODULAÇÃO DOS GENES RELÓGIO EM RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DEXAMETASONA.** 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

A melatonina é um hormônio regulado pelo ciclo claro/escuro. Sendo considerado um sinal de saída do relógio circadiano localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo. A melatonina regula funções envolvendo o metabolismo energético e comportamental em mamíferos. A síntese de melatonina pode ser influenciada por outros hormônios, a exemplo da insulina e dos glicocorticoides em condições patológicas e estresse. Estudos têm demonstrado que os glicocorticoides parecem modular os genes relógio em tecido periférico ocasionando doenças metabólicas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a funcionalidade da glândula pineal e a modulação dos genes relógio em ratos tratados cronicamente com dexametasona. Ratos Wistar (200-250g) foram divididos em 2 grupos: Controle (CON) e Tratados com dexametasona (DEX). Os animais DEX receberam 2mg/kg de peso de dexametasona intraperitonial durante 10 dias consecutivos e os animais CON receberam o volume correspondente de solução salina intraperitonialmente. Os animais de ambos os grupos tiveram o perfil de glicose avaliado e apresentaram pontos de hiperglicemia acentuada durante a noite ($p<0,05$). Os animais de ambos os grupos foram sacrificados nos ZT17 ao ZT22 e tiveram a glândula pineal e o plasma coletados. Os dados obtidos mostram um quadro de hiperinsulinemia nos animais DEX ($p<0,05$). Os animais do grupo DEX apresentaram uma redução no conteúdo de melatonina total ($p<0,05$) associada à diminuição da atividade enzimática da AANAT ($p<0,05$). Nesses mesmos pontos os animais DEX apresentaram uma redução do transportador de glicose (Glut1) na glândula pineal e receptor de insulina (Insr) ($p<0,05$). Os níveis de RNAm dos genes do relógio Bma11, Per1, Per2, Cry1, Cry2 e Rev-*erbα* em pineais isoladas apresentaram aumento da expressão gênica ($p<0,05$). Estes resultados sugerem que o tratamento crônico com dexametasona é capaz de modular a síntese de melatonina, bem com também os genes relógio, estas evidências sugerem a possível presença de um elemento responsivo ao glicocorticoide funcional na região promotora desses genes na glândula pineal.

Descritores: Genes relógio; Glicocorticoides; Resistência à ação da insulina; Melatonina; Glândula Pineal.

ABSTRACT

SANTOS D.M. **EVALUATION OF THE PINEAL GLAND FUNCTIONALITY AND CLOCK GENES MODULATION OF RATS TREATED CHRONICALLY WITH DEXAMETHASONE.** 2013. 87p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Aracaju.

Melatonin is hormone regulated by the light/dark cycle. It is considered to be a signaling pathway of the circadian clock located in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. Melatonin also regulates functions involving the energetic and behavioral metabolism of mammals. However, the melatonin synthesis can suffer influence from other hormones, like insulin and other glucocorticoids, in pathological conditions and stress. Studies have shown that glucocorticoids seem to modulate clock genes in peripheral tissues leading to metabolic diseases. The objective of the present study was to evaluate the functionality of the pineal gland and clock genes modulation in rats treated chronically with dexamethasone. Male Wistar rats (200-250g) were divided in to two groups: Control (CON) and Dexamethasone-treated (DEX). Animals from DEX group had 2mg/kg body weigh of dexamethasone administered intraperitoneally for 10 consecutive days and control animals received equal volume of saline solution also intraperitoneally. The circadian profile of blood glucose was evaluated and presented increased points of hyperglycemia during the night ($p<0,05$). The animals were sacrificed at each time point and had their pineal gland and plasma collected. The obtained data demonstrate a significant hyperinsulinemia in DEX animals ($p<0,05$). The findings show a reduction in the melationin content ($p<0,05$) associated with a decrease in the enzymatic activity of AANAT ($p<0,05$). Also, in these points, DEX animals presented a reduction in the glucose transporter (Glut1) in the pineal gland and insulin receptor (Insr) ($p<0,05$). The levels of mRNA of the clock genes Bmal1, Per1, Per2, Cry1, Cry2 and Rev-erbα in the isolated pineal glands demonstrated an increase in the gene expression ($p<0,05$). These results suggest that chronic treatment with dexamethasone is capable of modulating melatonin synthesis, as well as the clock genes. This evidence also suggests the possible presence of a responsive element to the functional glucocorticoid in the promoter region of these genes in the pineal gland.

Key-words: Clock genes; Glucocorticoids; Insulin resistance; Melatonin; Pineal gland.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da inervação da glândula pineal em ratos……... 21

Figura 2: Via da síntese da melatonina…… 22

Figura 3: Representação dos eventos bioquímicos intracelulares no pinealócito que resultam na síntese de melatonina…… 23

Figura 4: Representação da relação do sistema circadiano envolvendo o sistema nervoso central e a glândula pineal……. 27

Figura 5: Representação do relógio molecular dos mamíferos……... 29

Figura 6: Representação da via de modulação do gene Per1 pelos glicocorticoides…….. 35

Figura 7: Perfil diário de glicose em animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)……..... 49

Figura 8: Avaliação da glicemia plasmática durante o teste de sensibilidade à insulina (K_{ITT}) no ZT2 em animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)……. 50

Figura 9: Avaliação da glicemia plasmática durante o Teste de Tolerância à glicose (gTT) no ZT2 representados pelo decaimento e pela área sobre a curva em animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)…… 51

Figura 10: Avaliação dos níveis de insulina plasmática nos ZT (ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22) em animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX).. 52

Figura 11: Quantificação dos níveis de melatonina nos ZT (ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)…… 53

Figura 12: Avaliação da atividade enzimática da AANAT melatonina nos ZT (ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)……. 54

Figura 13: Expressão gênica das enzimas TPH, AANAT e HIOMT nos ZT (ZT1´ ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados coı dexametasona (DEX)……... 55

Figura 14: Expressão gênica da enzima adenilato clicase (AC1) e do receptor adrenérgico nos ZT (ZT17, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)…… 56

Figura 15: Expressão gênica dos genes do relógio Bmal1e Rev-erbα nos ZT (ZT17, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)……... 57

Figura 16: Expressão gênica dos genes do relógio Per1, Per2, Cry1e Cry2 nos ZT (ZT17, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)…… 58

Figura 17: Expressão gênica do receptor para insulina (Insr) e transportador de glicose (GLUT1) nos ZT (ZT17, ZT21 e ZT22) em glândulas pineais isoladas de animais Controle (CON) e tratados com dexametasona (DEX)…….. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeitos do tratamento crônico com dexametasona sobre os parâmetros metabólicos e corporais…….. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AANAT: arilalquilamina N-acetiltransferase

AC1: Adenilato ciclase I

Acetil CoA: acetil coenzima A

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: método de análise de variância

bHLH-PAS: "basic Helix-Loop-Helix – Period-Arnt-Single-minded"

BMAL1: "brain and muscle ARNT-like"

CaM: sistema Ca^{2+}/Calmodulina

cDNA: DNA complementar

CLOCK: "circadian locomoter output cycles kaput"

CON: animais controle

CRE: element responsive ao AMPc

CREB: proteína ligante ao elemento de resposta ao AMPc

DAG: diacilglicerol

DEX: animais tratados com dexametasona

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desorribonucleotídeo

DTT: ditiotreitol

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

GC: glicocorticoides

GCS: gânglio cervical superior

GLUT1: transportador de glicose isoforma 1

GLUT4: transportador de glicose isoforma 4

GRE: elemento responsive aos glicocorticoides

HIOMT: hidroxindol-oxi-metiltransferase

HPA: eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPLC: cromatrografia líquida de alta eficiência

ICER: “inducible cAMP early repressor”

IML: núcleo intermediolateral da medula espinhal

Insr: “insulin receptor”

IP: intraperitoneal

LAAD: L-aminoácido aromático

MT1: receptor 1 de mebrana para melatonina

MT2: receptor 2 de menbrana para melatonina

NAS: N-acetilserotonina

NPV: núcleo paraventricular

NPY: neuropeptideo Y

NQS: Núcleo supraquiasmático

PBS: Salina Tamponada Fosfatada

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteina quinase C

RNA: Ácido ribonucleico

RORE: elemento ROR

Rpl37a: Proteína ribossomal L37a

TPH: Triptofano hidroxilase

ZT: “Zeitgeber Time”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 19
2.1 Histórico da Glândula Pineal..... 19
2.2 Anatomia e Inervação da glândula pineal 20
2.3 Síntese de melatonina..... 21
2.4 Sistema Circadiano..... 26
2.4.1 Relógio circadiano em nível molecular..... 27
2.5 Glicocorticoides..... 30
2.5.1 Glicocorticoides e melatonina..... 32
2.5.2 Glicocorticoides e genes do relógio..... 34
3 OBJETIVOS 37
3.1 Objetivo geral..... 37
3.2 Objetivos específicos..... 37
4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS 38
4.1 Delineamento experimental..... 38
4.2 Tratamento com dexametasona..... 39
4.3 Avaliação do ritmo circadiano de glicose..... 39
4.4 Teste de tolerância à insulina - Kitt 40
4.5 Teste de tolerância à glicose (GTT)..... 40
4.6 Procedimento adotado para a retirada do tecido..... 41
4.7 Dosagem de insulina por radioimunoensaio 41
4.8 Homeostasis model Assessment (HOMA)..... 42
4.9 Dosagem de melatonina por HPLC..... 43
4.10 Análise radiométrica da atividade enzimática da AANAT..... 44
4.11 Avaliação da Expressão gênica 45
4.11.1 Extração do RNA total..... 45
4.11.2 Obtenção de cDNA..... 46
4.11.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real..... 46
4.12 Análise Estatística..... 47
5 RESULTADOS..... 48
5.1 Parâmetros metabólicos e corporal..... 48
5.2 Avaliação do ritmo circadiano de glicose..... 49
5.3 Testes de sensibilidade à insulina curto - K_{itt} 50
5.4 Teste de Tolerância a Glicose (GTT)..... 50
5.5 Dosagem de Insulina..... 51
5.6 Dosagem de melatonina..... 52

5.7 Atividade da AANAT…….. 53
5.8 Análise da expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina……. 54
5.9 Expressão gênica dos genes do relógio na glândula pineal……. 56
5.9.1 Expressão do receptor para insulina (Inrs) e Glut1…… 58
6 DISCUSSÃO..... 60
7 CONCLUSÃO..... 66
REFERÊNCIAS……. 67
APÊNDICE A- Aprovação do comitê de ética……... 85
APÊNDICE B – Sequências dos primers utilizados……... 86
ANEXO A- Comprovante de submissão do artigo…….. 87

1 INTRODUÇÃO

A glândula pineal desempenha um papel essencial na cronobiologia dos vertebrados, através da conversão do sinal luminoso captado por fotorreceptores na retina em um sinal hormonal, a melatonina. A concentração deste hormônio encontra-se sempre elevado durante a noite e é regulado diretamente pelo ritmo circadiano (BAILEY et al., 2009). Os ritmos biológicos dos mamíferos é ajustado diretamente pelo "relógio circadiano mestre" localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) (DUNLAP, 1999; MOORE; LENN, 1972). Atuando no controle da ritmicidade dos fatores biológicos, os quais apresentam padrão endógeno nos mamíferos dependente da expressão de componentes funcionais, "os genes relógio", essenciais na regulação do relógio biológico (REPPERT; WEAVER, 2001).

Além do núcleo supraquiasmático do hipotálamo os genes relógios também são encontrados na glândula pineal de mamíferos (NAMIHIRA et al., 1999). Embora estudos tenham sugerido que a glândula pineal nos mamíferos tenha perdido a ritmicidade endógena ao longo do processo evolutivo (ABE et al., 2002), estudos recentes têm mostrado que a glândula pineal expressa componentes de um relógio circadiano funcional (KAROLCZAK et al., 2004; VON GALL et al., 2001), embora a função dos genes relógio na glândula pineal ainda não esteja bem compreendida.

É sabido que a melatonina é um neuro-hormônio que participa de uma ampla variedade de funções da fisiologia dos mamíferos, entre elas podemos citar, a sincronização das funções dos principais órgãos envolvidos na regulação da glicose sanguínea e insulina (PICINATO et al., 2002), reduzindo os níveis séricos de lipídeos em espécies de mamíferos e ajudando a prevenir o estresse oxidativo em indivíduos diabéticos (KLEPAC et al., 2006; MONTILLA et al., 1998; NISHIDA et al., 2005) atua na melhora da resistência à ação da insulina periférica (SARTORI et al., 2009). Além de que, a glândula pineal possui no seu interstício componentes da via de sinalização insulinica, semelhantes aos encontrados em tecidos insulinos sensiveis (PELICIARI-GARCIA et al., 2010).

Estudos demonstraram que a síntese de melatonina é reduzida em ratos diabéticos tratados com estreptozotocina (AMARAL, 2009) e aloxana (PANG et al., 1985). Além disso, a síntese de melatonina pode ser modulada negativamente por glicocorticoides, a exemplo de ratos submetidos ao estresse excessivo (OTSUKA et al., 2001) ou quando perfundidos intracerebroventricularmente com corticosterona (ZHAO; TOUITOU, 1993). Sugerindo

assim, que os glicocorticoides podem modular os mecanismos intracelulares que regulam a síntese e secreção da melatonina (DEMISCH et al., 1988). No entanto, na literatura encontram-se dados controversos, como a potencialização da síntese de melatonina noturna em ratos perfundidos com corticosterona (FERNANDES et al., 2009), foi evidenciado também que glândulas pineais de ratos quando incubadas com corticosterona apresentaram aumento nos níveis de atividade da AANAT e melatonina (FERREIRA et al., 2005). Tais evidências sugerem uma relação estreita entre a glândula pineal e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA).

Os glicocorticoides são hormônios esteroides cuja produção e secreção é comandada pelo eixo HPA influenciando vários processos biológicos (SON et al., 2011), a exemplo da manutenção da homeostase do sistema nervoso central, metabolismo intermediário e da resposta imune/inflamatória (BOUMPAS, 1993; CHROUSOS et al., 2007; KINO, 2004). Além destes efeitos, existem evidências da interação entre o eixo HPA e componentes do relógio biológico em mamíferos (BALSALOBRE et al., 2000; NADER et al., 2010). Sabe-se que os glicocorticoides tem sua síntese regulada pelo relógio circadiano, a exemplo de outros hormônios, atuando como um sinal de saída da glândula adrenal (DICKMEIS et al., 2007).

Sabendo-se que os glicocorticoides podem modular componentes do relógio circadiano periférico, bem como, os níveis de melatonina, e os trabalhos encontrados na literatura sobre a interação da glândula pineal com o eixo HPA ainda são contrastantes. Ademais, a modulação dos genes relógio na glândula pineal pelos glicocorticoides diferentemente de outros tecidos, permanece desconhecida. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a funcionalidade da glândula pineal e a modulação dos genes relógio em ratos tratados cronicamente com dexametasona. Levando em consideração também as alterações metabólicas ocasionadas pelo tratamento com os glicocorticoides.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico da Glândula Pineal

Na cultura ocidental, a glândula pineal é citada desde a antiguidade, os primeiros relatos foram feitos pelo médico grego Herófilo (325-328 a.C), segundo seus escritos, se acreditava que a glândula pineal era uma espécie de "válvula" que regularia o pneuma (spiritus, em latim), através do terceiro e quarto ventrículo. Nesta visão o ar seria transformado no coração em pneuma zootikon (spiritus vitalis, em latim), para ser posteriormente enviado ao sangue e cérebro, onde se transformaria dentro dos ventrículos cerebrais em psychikon pneuma (spiritus animalis, em latim) (ARIENS-KAPPERS, 1979).

Galeno (131-200 d.C), médico e filósofo, descreveu em detalhes a anatomia do órgão pineal, relegando a este um papel meramente funcional de um orgão línfatico pseudoglandular (LÓPEZ-MUÑOZ; MARÍN; ÁLAMO, 2010). A glândula pineal na fisiologia humana ganhou importância no século XVII com o nascimento da ciência moderna em que René Descartes (1596-1564), afirmou que neste órgão glandular se estabelece a "sede da alma", funcionando como um "transdutor de sinal" entre o mundo externo e o meio interno (LÓPEZ-MUÑOZ; BOYA, 1992). A partir da segunda metade do século XIX acontece o rompimento da fase pré-científica do conhecimento da glândula pineal relacionada às bases antropofilosóficas, e iniciam-se estudos para desvendar o seu verdadeiro papel fisiológico. Na transição entre o século XIX e o XX foram publicados os primeiros trabalhos na literatura científica enfocando a natureza endócrina da glândula pineal (LÓPEZ-MUÑOZ; MARÍN; ÁLAMO, 2010).

No entanto, a glândula pineal foi considerada como um simples órgão vestigial nos mamíferos sem nenhuma função fisiológica até a década de 1950. A partir deste período (1954-1965) iniciou-se a elucidação do papel da glândula pineal sobre o organismo, deixando de ser um mero órgão vestigial para ser considerado um "transdutor neuroendócrino" (WURTMAN; AXELROD, 1965). Um marco importante neste período da história na pesquisa científica envolvendo a glândula pineal culminou com a descoberta da melatonina em 1958, pelo dermatologista americano Aaron Lerner e colaboradores, recebendo este nome devido às propriedades de clareamento existente na pele em peixes e anfíbios (LENER, 1958).

A melatonina veio ganhar maior atenção no mundo científico quando foi verificada a sua ação na regulação e redefinição do ritmo circadiano (REDMAN et al., 1983). Desencadeando uma série de estudos relacionados à sua função em várias espécies de animais nos últimos 54 anos.

2.2 Anatomia e Inervação da Glândula Pineal

A glândula pineal é um pequeno órgão endócrino derivado do diencéfalo e localizado na região epitalâmica (REITER, 1981), embriologicamente tem a mesma origem da retina formando um "sistema fotoneuroendocrino", atuando de forma integrada seguindo um padrão rítmico (KALRA et al., 2012). A glândula pineal tem o seu desenvolvimento embrionário em humanos na oitava semana de gestação, surgindo como uma evaginação da porção diencefálica do terceiro ventrículo entre as comissuras habenular e posterior. Em humanos a glândula pineal após o nascimento apresenta aumento de volume, ficando estável a partir dos 2 anos de idade (DUVERNOY et al., 2000).

A glândula pineal em diversas espécies de mamíferos, inclusive nos humanos apresenta uma forma piramidal, localizando-se sobre a parte dorsal do tronco cerebral. Em roedores, a glândula pineal é subdividida em duas partes: a pineal superficial localizada na superfície dorsal do cérebro e a pineal profunda localizada entre a comissura habenular e posterior, ambas são ligadas através de uma estrutura chamada pedúnculo pineal (MØLLER; BAERES, 2002; VOLLRATH, 1982). Na glândula pineal de mamíferos predominam dois tipos celulares: os astrócitos e os pinealócitos, sendo este encontrado em maior quantidade e responsável pela secreção da melatonina (MØLLER; BAERES, 2002).

A sincronização da glândula pineal com o ciclo claro/escuro dá-se por meio de células ganglionares fotorreceptoras presentes na retina. O sinal luminoso é conduzido principalmente pelo trato retino- hipotalâmico para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) (MOORE; LENN, 1972), sendo retransmitido para o núcleo paraventricular (NPV), do qual emitem projeções da via dorsal e ventral que atingem o núcleo intermediolateral da medula espinhal (IML), o sinal é então emitido por projeções até gânglio cervical superior (GCS), como consequência, ativam as fibras pós-ganglionares noradrenérgicas, culminando

na estimulação da glândula pineal e secreção de melatonina (MØLLER; BAERES, 2002; TAKAHASHI, 1994) (Figura 1).

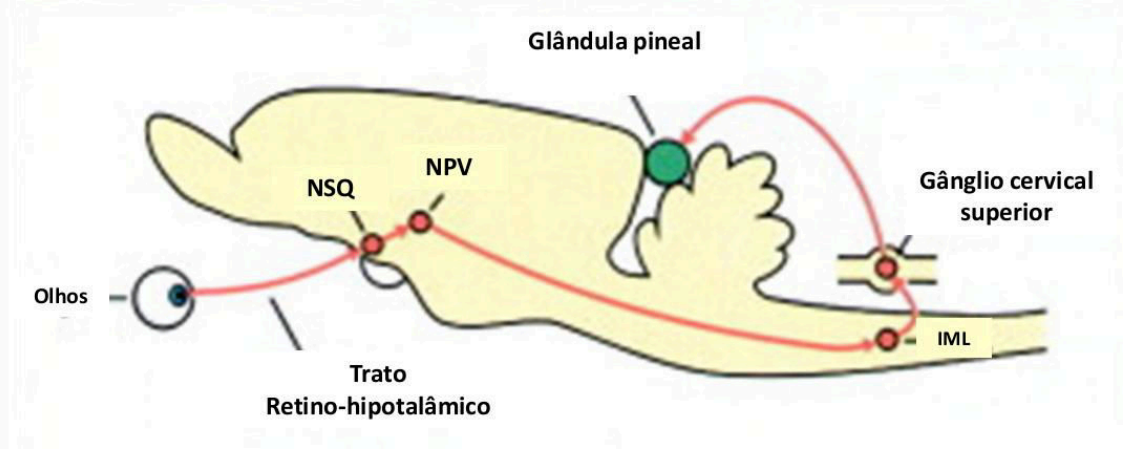


Figura1: Representação da inervação da glândula pineal em ratos. O sinal luminoso é detectado pela retina, gerando um sinal que é transmitido pelo trato retino-hipotalâmico ao núcleo supraquiasmático do hipotálamo (SCN), o qual contém um relógio circadiano. Esta via inclui o núcleo paraventricular (PVN), neurônios pós-ganglionares da coluna intermediolateral (IML) e gânglio cervical superior (SCG) inervando a glândula pineal. Figura modificada de TAKAHASHI, 1994.

2.3 Síntese de Melatonina

A melatonina (N-acetil 5-metoxitriptamina), hormônio secretado e liberado pela glândula pineal durante a noite, contribui para uma ampla variedade de funções fisiológicas em mamíferos (CHATTORAJ et al., 2009). O sinal regulador da síntese de melatonina é a alternância diária de luz e escuridão, a síntese de melatonina é elevada durante a noite em todos os organismos estudados independente de seus padrões de atividade (GRIVAS; SAVVIDOU, 2007; MACCHI; BRUCE, 2004).

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano sendo hidroxilado pela triptofano hidroxilase (TPH), resultando na formação do 5-hidroxitriptofano, após esta etapa, é descarboxilado por um aminoácido aromático, a descarboxilase L-aminoácido aromático (LAAD) em serotonina. A serotonina é acetilada pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) em N-acetilserotonina que posteriormente é convertida em melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) pela ação da enzima hidroxi-indol-O-

metiltransferase (HIOMT) (ARENDT, 1998; CIPOLLA-NETO et al., 1999; ZAWILSKA et al., 2009; WEISSBACH et al., 1960) (Figura 2).

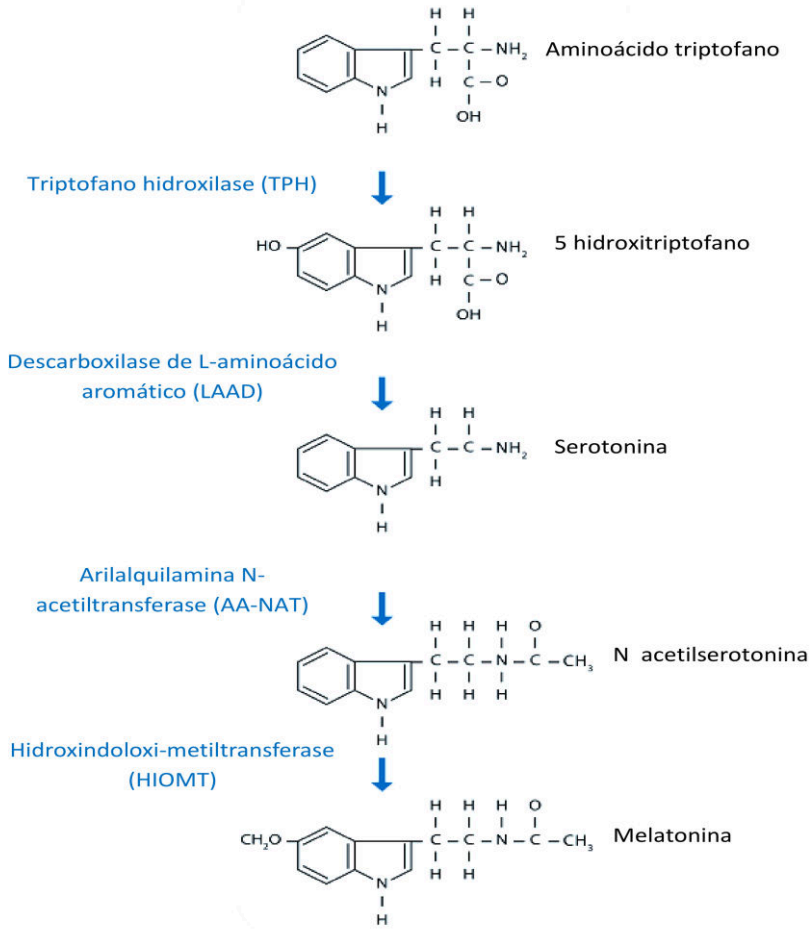


Figura 2: Via da síntese de melatonina. O aminoácido triptofano é hidroxilado pela triptofano hidroxilase (TPH) formando o 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado pela descarboxilase de L-AMINOÁCIDO aromático (LAAD) em serotonina. A serotonina é acetilada pela arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT) em N-acetilserotonina que por sua vez é metilada pela enzima hidroxi-indol-O-metiltransferase (HOMT) em melatonina. Figura modificada de GRIVAS, 2007.

O processo de síntese da melatonina durante o período noturno, origina-se a partir da interação da noradrenalina (NE) liberada pelas terminações sinápticas das fibras pós-ganglionares com os receptores pós-sinápticos α1 e β1 adrenérgicos presentes na membrana dos pinealócitos que quando ativados desencadeiam eventos bioquímicos intracelulares, resultando na síntese de melatonina (SCHAAD et al., 1995). Os receptores β1-adrenérgicos, quando ativados resultam no aumento da atividade da proteína G estimulatória (Gs),

aumentando a produção de adenilato ciclase (AC) e consequente aumento dos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

O aumento dos níveis de AMPc é de fundamental importância, uma vez que este ativa a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e fosforila a proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), estes eventos interagem com o elemento responsivo ao AMPc (CRE) ocasionando a ativação da transcrição gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina (BORJIGIN et al., 1999). Já a estimulação dos receptores α1 adrenérgicos estimula a via mediada pelos receptores β1-adrenérgicos, promovendo o aumento da concentração de Ca^{+} e diacilglicerol (DAG) mediado pela proteína quinase C (PKC) (GANGULY et al., 2001; SUGDEN; KLEIN, 1988).

O aumento nos níveis do AMPc contribuem para o aumento da expressão gênica da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT), através da ativação da PKA. Estes eventos cursam com a fosforilação da AANAT, forma molecular capaz de interagir com a proteína 14-3-3, originando assim, o complexo pAANAT/14-3-3. Como consequência, a AANAT no estado complexado é protegida da destruição proteolítica (BALER et al., 1997; GANGULY et al., 2002; KLEIN et al., 2006) (Figura 3).

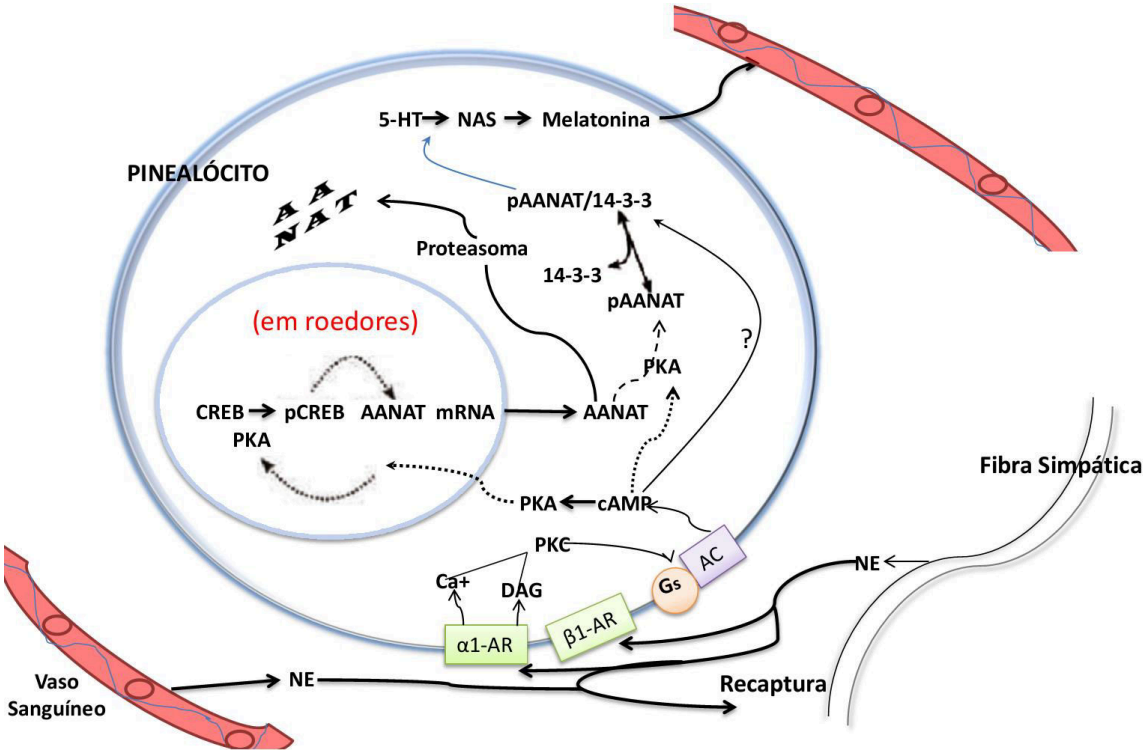


Figura 3: Representação dos eventos bioquímicos intracelulares no pinealócito que resultam na síntese de melatonina. Figura adaptada de GANGULY et al., 2002.

A AANAT é a enzima limitante da síntese de melatonina (KLEIN et al., 1997), sendo expressa nos fotorreceptores da retina e na glândula pineal (NIKI et al., 1997). Segundo a literatura, sua atividade é aumentada em torno de 50 à 100 vezes durante a noite ocasionando o aumento da produção e liberação de melatonina (KLEIN, 2007). O gene da AANAT possui em sua região promotora um elemento responsivo ao AMPc (CRE) o qual estimula a transcrição da AANAT devido ao aumento da concentração intracelular de AMPc (BALER et al., 1997). Na glândula pineal a redução da transcrição da AANAT por sua vez, ocorre a partir da segunda metade da noite e está associada à desfosforilação da CREB. Além disso, foi relatado a existência de outro mecanismo inibitório que atua diretamente sobre o elemento responsivo ao AMPc (CRE), o ICER (do inglês, "inducible cAMP early repressor"), como consequência, ocorre a redução da transcrição da AANAT (BORJIGIN et al., 1999). Além disso, estes autores detectaram ainda que o ICER apresenta pico durante a segunda metade da noite precedendo o declínio da síntese da melatonina.

Além da AANAT outras duas enzimas envolvidas na formação da melatonina como a triptofano hidroxilase (TPH) e a hidroxi-indol-O-metiltransferase (HIOMT) (ALOYO; WALKER, 1987; ARENDT,1998; AXELROD et al., 1965). A triptofano hidroxilase é a primeira enzima da via de síntese de melatonina, envolvida na catalisação e transformação do aminoácido triptofano em serotonina (5-hidroxitriptofano, 5-HT) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). A síntese de serotonina, por sua vez, está limitada pelo grau de atividade da triptofano hidroxilase (TPH), que é aumentada cerca de duas vezes durante o período noturno (EHRET et al., 1991). Contudo, é evidenciada uma queda brusca de sua atividade no meio da noite, tendo como consequência um aumento da concentração de N-acetilserotonina (NAS), resultando na síntese e secreção de melatonina (LIU et al., 2006).

A síntese e atividade da TPH na glândula pineal de ratos são estimuladas pelo aumento da atividade simpática. A noradrenalina quando secretada logo após o início da escuridão, promove o aumento da síntese de AMPc intracelular, estes eventos cursam com a ativação da PKA que por sua vez é capaz de fosforilar a proteína TPH pelo sistema Ca^{2+} /Calmodulina (CaM) (EHRET et al., 1991; KUHN et al., 1997). A fosforilação de TPH por Ca^{2+}/Calmodulina permite sua associação com a proteína 14-3-3, garantido assim, a estabilidade da TPH (KLEIN et al., 2003). Os níveis de transcrição de TPH apresentam-se ligeiramente aumentados a noite em relação ao dia na glândula pineal de ratos (SUGDEN,

2003). Contudo a regulação pós-traducional da TPH parece ser mais importante do que a ativação transcricional na formação da serotonina (HUANG et al., 2008).

O produto resultante da N-acetilação da serotonina pela AANAT é a N-acetilserotonina (NAS), molécula que é rapidamente convertida em melatonina pela ação enzimática da HIOMT (AXELROD; WEISSBACH, 1961). Os níveis do RNAm e da atividade enzimática da HIOMT são detectados no período diurno e noturno. Tais variações são controladas pelo relógio endógeno, sendo que o aumento noturno da transcrição da HIOMT resulta principalmente da estimulação de receptores β1- adrenérgicos (RIBELAYGA et al.,1999). Os níveis de RNAm da HIOMT durante o período noturno após estimulação dos receptores β1- adrenérgicos também é dependente de AMPc resultando na fosforilação de CREB induzindo assim, o aumento da expressão do gene da HIOMT (RIBELAYGA et al., 1999). Sugere-se que a transcrição da HIOMT durante o dia é resultante de uma segunda via mediada pelo Neuropeptídeo Y (NPY), este neurotransmissor promove o aumento intracelular dos níveis de cálcio que é essencial na transcrição gênica da HIOMT (RIBELAYGA et al., 1997). Já a atividade enzimática parece ser controlada por transmissores não adrenérgicos (RIBELAYGA et al., 1999) uma vez que a estimulação noradrenérgica aumenta os níveis de transcrição da HIOMT, mas não tem efeito em curto prazo sobre a atividade enzimática (CEINOS et al., 2004).

A melatonina, imediatamente após sua síntese é secretada para o meio extracelular, sendo posteriormente liberada na circulação, a qual é direcionada a diversos fluidos, tecidos e compartimentos celulares (ARENDT, 1995; ZAWILSKA et al., 2009). A melatonina circulante, presente na corrente sanguínea, é capaz de interagir com seus receptores transmembrana, localizados nos diferentes tecidos sensíveis a este hormônio, são classificados em MT1 (Mel1a), MT2 (Mel1b) e MT3 (ML2). Os receptores MT1 e MT2 pertencem a família de receptores acoplados a proteína Gi (HUANG et al., 2005; REPPERT et al., 1995), a ativação do receptor de melatonina MT1 promove a inibição da taxa de disparo neuronal no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ) e a secreção de prolactina da Pars Tuberalis. Já a ativação do receptor MT2 foi demonstrado que pode desencadear muitos efeitos, a exemplo da condução de ritmos circadianos gerados no SNC, inibir a liberação de dopamina na retina e reduzir o rolamento de leucócitos na microvasculatura. A ativação do receptor de melatonina MT3 na retina promove a redução da pressão intraocular e inibe a ação

leucotrieno B4, molécula responsável pela inibição da adesão de leucócitos neste tecido especificamente (DUBOCOVICH et al., 2003).

2.4 Sistema Circadiano

O relógio circadiano tem como principal função auxiliar os animais e seres humanos na antecipação das mudanças do ambiente diante de alterações da disponibilidade de alimentos, do potencial risco diante de predadores, como também, exerce um papel importante na probabilidade de êxito reprodutivo (KALSBEEK et al., 2012). Além disso, o sistema circadiano é de fundamental importância na regulação de várias atividades metabólicas e fisiológicas (YAN et al., 2008).

O relógio circadiano pode ser influenciado por fatores ambientais, a exemplo da luz, som, temperatura, atividade física e ingestão de alimentos (YOUNG et al., 2007). Alguns autores sugerem que as alterações do ritmo circadiano por estes fatores ambientais podem contribuir para desajustes metabólicos tais como o aumento da incidência de diabetes mellitus tipo 2, obesidade e doenças cardiovasculares (YOUNG et al., 2007). Foi relatado que trabalhadores noturnos apresentam um maior risco de desenvolverem doenças metabólicas e cardiovasculares, possivelmente resultado da má adaptação fisiológica ao ato de comer e dormir em tempos circadianos anormais (SCHEERA et al., 2009). Além disso, estas pessoas apresentam uma redução da secreção de insulina durante o mesmo período.

O ritmo circadiano implica em uma repetição de eventos fisiológicos que ocorre com uma frequência de 24 horas em vários organismos. O sistema circadiano recebe um sinal do meio ambiente *"Zeitgeber"* (doador de tempo, em alemão) ou sincronizador, podendo levar a modulação do sistema endógeno (LOWREY; TAKAHASHI, 2004; MOORE, 1997). Sabe-se que o sistema circadiano de mamíferos é formado por três componentes principais: Sinais de entrada, a exemplo da luz, um relógio circadiano mestre e sinais de saída. Inicialmente o sinal de entrada irá conduzir um estímulo para o relógio circadiano que é autossustentado e que por sua vez regula os sinais de saída (fisiológicos e/ou comportamentais) (HASTINGS et al., 2003; KWON et al., 2011). O sinal luminoso detectado pela retina é transmitido para o núcleo supraquiasmático do hipotálamo (NSQ), tendo como um dos sinais de saída à melatonina

(KLEIN et al., 1997; MOORE; LENN, 1972; REPPERT; WEAVER, 2002). Esta por sua vez, interage com seus receptores localizados no SNC, Pars tuberalis (PT) e outros tecidos periféricos, o qual por sua vez, desencadeia a propagação do sinal (STEHLE et al., 2003) (Figura 4). A melatonina funciona assim como um Zeitgeber interno, capaz de modular a expressão dos genes relógio em tecidos periféricos (DARDENTE et al., 2003; KORF; VON GALL, 2006).

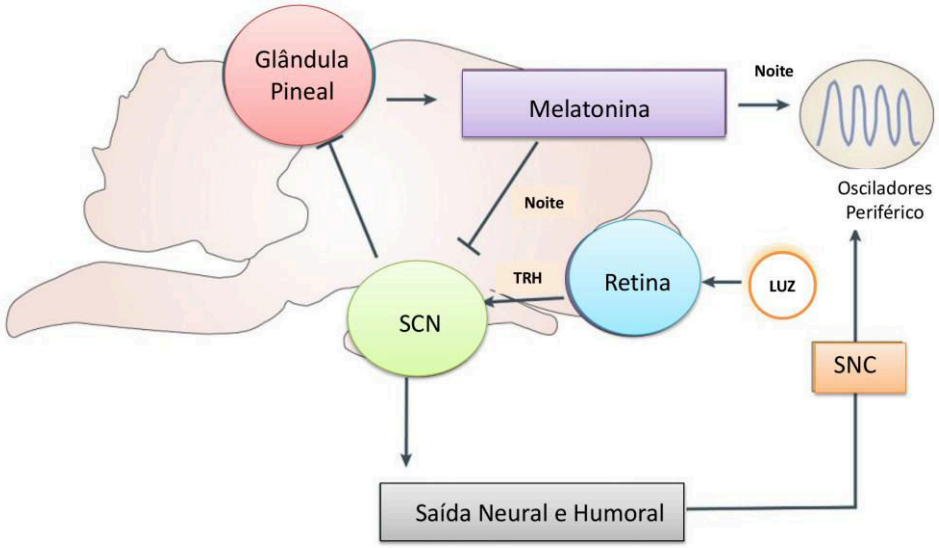


Figura 4: Representação do sistema circadiano envolvendo sinais de entrada, o NSQ e sinais de saída. Modificado de BELL-PEDERSEN et al.,2005.

2.4.1 Relógio circadiano ao nível molecular

O relógio mestre, localizado no núcleo supraquiasmático, é responsável por controlar a ritmicidade nos mamíferos, apresentando um padrão endógeno dependente da expressão de seus genes (REPPERT; WEAVER, 2001). Estudo realizado em Drosophila melanogaster relatou a importância dos genes relógio no ritmo circadiano e que as alterações destes genes poderiam modular a ritmicidade (KONOPKA; BENZER, 1971). Nos anos subsequentes foi

identificado em Drosophila, o gene Period (dPer) responsável pelo ritmo circadiano da atividade locomotora (DULAMP et al., 1999) a partir deste diversos estudos foram realizados para compreender o mecanismo e importância dos genes relógio.

Sabe-se que existem três genes Per em ratos, sendo que todos são homólogos do gene Per encontrados em Drosophila contendo um domínio PAS (TEI et al., 1997). O gene hPer1 e rPer1 foram identificados em humanos e em ratos respectivamente, dentre estes, o gene rPer1 apresenta oscilação circadiana autônoma da sua expressão no NSQ do hipotálamo (DULAMP et al., 1999). Estudos sugerem que a expressão do gene Per no sistema nervoso central desempenha um papel central na geração e arrastamento do ritmo circadiano em mamíferos (SHIGEYOSHI et al., 1997). O gene mPer2 foi isolado na mesma época em células do cérebro de ratos apresentando homologia com mPer1 (TAKUMI et al., 1998). O terceiro gene clonado foi o mPer3 apresentando homologia de 37% na sequência de aminoácidos em relação a mPer1 e mPer2, e é expresso no NSQ além de tecidos periféricos (ZYLKA et al., 1998).

O relógio circadiano de mamíferos envolve dois ciclos de retroalimentação transcricionais que atuam de forma integrada, regulando a expressão gênica positivamente ou negativamente dos componentes do relógio circadiano (DUNLAP, 1999), entre eles podemos citar as proteínas CLOCK (circadian locomoter output cycles kaput) e BMAL1 (brain and muscle ARNT-like) que pertencem a família de fatores basic–helix–loop–helix-PAS (bHLH)-PAS (GEKAKIS et al., 1998) formando um heterodímero CLOCK/BMAL1 que ao interagir com a caixa E-box dos genes alvos Period (Per1, Per2 e Per3) e Cryptochromes (Cry1 e Cry2) desencadeia o feedback positivo do controle da via (ALBRECHT et al., 2001; GEKAKIS et al., 1998; LOWREY; TAKAHASHI, 2004).

Com a ativação dos genes alvos pelo heterodímero CLOCK/BMAL1 as proteínas resultantes mPER e mCRY formam um complexo negativador PER/CRY, que é translocado de volta para o núcleo onde irá atuar diretamente no complexo CLOCK/BMAL1 como regulador negativo, regulando assim, a sua própria transcrição (Figura 5). A segunda alça de regulação envolve o receptor nuclear REV-ERBα e RORα que participam da regulação da expressão de Bmal1, inibindo ou ativando a transcrição respectivamente, ambos competem por se ligar ao elemento ROR (RORE) na região promotora de Bmal1 (ALBRECHT; EICHELE, 2003; DUEZ; STAELS, 2008). Já o mPer3 parece não ter um papel importante na

manuntenção da realimentação do loop de entrada e saída (REPPERT; WEAVER, 2002) (Figura 5).

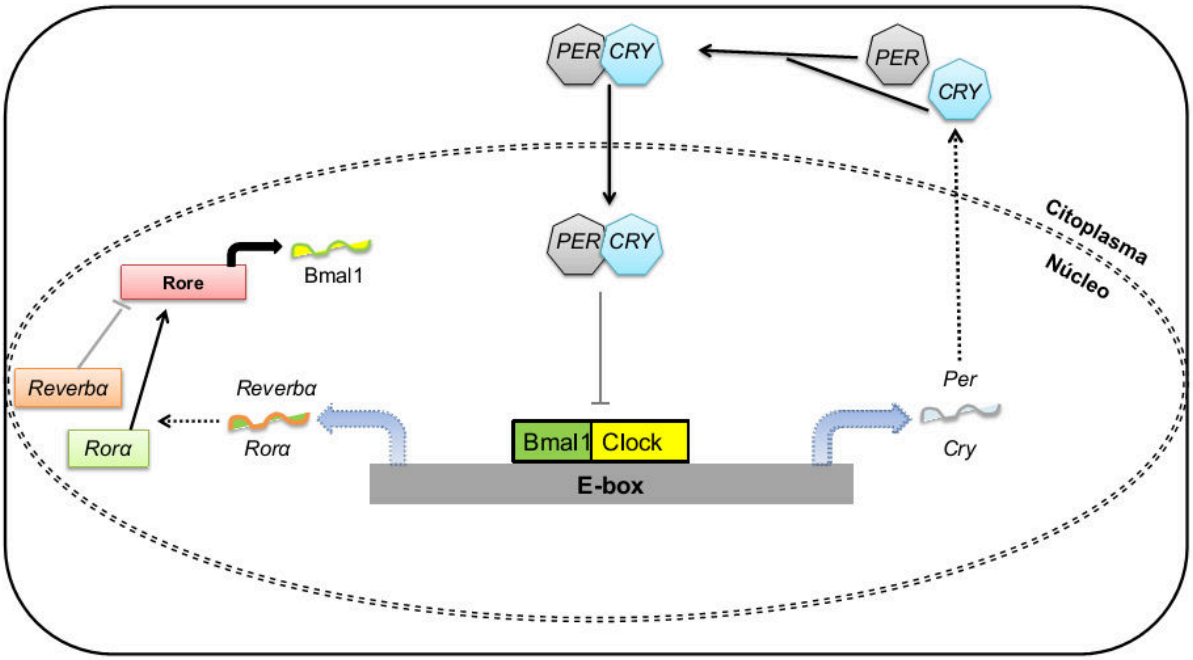


Figura 5: Representação do relógio molecular dos mamíferos. Modificado de KWON et al., 2011.

Nos mamíferos, a expressão dos genes do relógio não está restrita ao SNC, mas foram detectados em outros tecidos neurais fora do SNC e em tecidos periféricos (KAROLCZAK et al., 2005; LOWREY; TAKAHASHI, 2004). Sabe-se que a glândula pineal de ratos apresenta os principais componentes de um relógio circadiano funcional (Per1, Per2, Cry1, Cry2, Baml1 e Rev-*erbα*) (NAMIHIRA et al.,1999; SIMONNEAUX et al., 2004), embora até o presente momento o papel dos genes relógio na modulação da síntese de melatonina ainda não esteja bem compreendido. A maioria dos genes relógio na glândula pineal apresenta um padrão de expressão nos ratos durante o período noturno (Per1, Per2, Cry1 e Cry2) (SIMONNEAUX et al., 2004; WONGCHITRAT et al., 2009). Já Bmal1 apresenta expressão aumentada por volta do ZT6 diferindo do padrão apresentado no NSQ (NAMIHIRA et al., 1999), o qual apresenta pico de expressão no ZT18 (HONMA et al., 1998). Já o Rev-erb*α* é expresso na glândula pineal de roedores com valores máximos de expressão gênica no final da fase de luz.

O gene da AANAT em sua região promotora além de apresentar um domínio CRE (BALER et al., 1997), apresenta um E-box, o qual é capaz de mediar à transcrição da AANAT pela ação do heterodímero CLOCK/BMAL1 (CHEN; BALER, 2000). Em retinas, a transcrição da AANAT é modulada pelos genes relógio circadiana (APPELBAUM et al., 2006; CHEN; BALER, 2000). Contudo, a expressão da AANAT na glândula pineal parece ser controlada preferencialmente pela via AMPc/CRE, embora o E-box desempenhe papel na regulação da especificidade do tecido, mas não na ritmicidade da glândula pineal (HUMPHRIES et al., 2007).

2.5 Glicocorticoides

Os glicocorticoides (GC) são secretados a partir da zona fasciculada e reticular do córtex da glândula adrenal (KEMPPAINEN; BEHREND, 1997), tendo sua secreção regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (CHROUSOS, 1995; KINO 2004). Resumidamente, o fator liberador da corticotropina (CRF) liberado pelo hipotálamo estimula a produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na glândula hipófise, que por sua vez, estimula o córtex da adrenal a produzir os glicocorticoides (GAYTON, 2011).

Os níveis de glicocorticoides são regulados pelo sistema circadiano. Em humanos, o ritmo circadiano de cortisol plasmático e corticosterona segue uma proporção de (13:1 pg/ml) ao longo do ciclo claro/escuro. Já na maioria dos roedores, a corticosterona é o esteroide predominante ao longo das 24 horas (KALSBEEK et al., 2012). Em animais diurnos e seres humanos, a síntese de cortisol dá-se ao início da manhã. Já animais de hábito noturno, a exemplo dos ratos, o pico de corticosterona ocorre no início da noite (NADER; CHROUSOS; KINO, 2010).

Os glicocorticoides são hormônios esteróidais, lipossolúveis que exercem os seus efeitos pleiotrópicos mediados pelos receptores que pertencem à superfamília de receptores nucleares de glicocorticoide (GR) ubiquamente expressos em quase todos os tecidos e órgãos de ratos e humanos (GROSS; CIDLOWSKI, 2008; KINO; CHROUSOS, 2004). Os glicocorticoides, ao interagir com seu receptor é capaz de regular positiva ou negativamente a atividade de transcrição de milhares de genes responsivos a glicocorticoides, através da

ligação ao elemento responsivo aos glicocorticoides (GRE), que são sequências específicas de DNA localizadas na região promotora do gene alvo (CHROUSOS; KINO, 2005).

Os glicocorticoides desempenham importante papel na regulação da homeostase (KINO, 2004), além de possuir propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras (BOUMPAS, 1993; FRANCHIMONT, 2004) atuando em muitas doenças inflamatórias, autoimunes e linfoproliferativas (TAIT et al., 2008). Contudo, o excesso de glicocorticoides causado por hipercortisolismo endógeno ou por administração exógena de fármacos (dexametasona, por exemplo) para o combate de inúmeras doenças, pode levar o indivíduo a desenvolver Síndrome de Cushing (CHRIST-CRAIN et al., 2008), aumento das taxas de lipólise e obesidade visceral (DIVERTIE et al., 1991), atrofia muscular (AUCLAIR et al., 1997; ITAGAKI et al., 2010), redução da formação óssea, aumento da reabsorção óssea (LANE; LUKERT, 1998), redução da captação de glicose, podendo desencadear um quadro de resistência à ação da insulina e obesidade central (GATHERCOLE et al., 2011; SCHACKE et al., 2002) As comorbidades associada à obesidade incluem dislipidemia, resistência à insulina, diabetes tipo 2 (DM2), os quais contribuem para o aumento da mortalidade (GATHERCOLE et al., 2007).

O desenvolvimento de um estado de resistência periférica a ação da insulina com base na administração de glicocorticoide exógeno é um fenômeno bem conhecido (MCGHEET et al., 2002). É definida como uma resposta diminuída à insulina, resultando em altos níveis de glicose sanguínea, e consequentemente um aumento da secreção plasmática de insulina dependente das ilhotas pancreáticas, observando-se uma hiperinsulinemia compensatória, na tentativa de garantir os níveis plasmáticos de glicose em condições fisiológicas (DEFRONZO; FERRANNINI, 1991). Estudos realizados com a dexametasona, um glicocorticoide sintético com amplo espectro de ação, sendo 25 a 30 vezes mais potente que o cortisol, seu análogo natural (RAMOS, 2004), demostram que a mesma pode induzir um quadro de resistência à ação da insulina em ratos tratados com 1mg/kg de peso corporal durante 5 dias (RAFACHO et al., 2010), sendo utilizada como modelo experimental no entendimento da resistência à ação da insulina periférica (diabetes tipo 2) e suas comorbidades.

2.5.1 Glicocorticoides e melatonina

Embora as interações entre a glândula pineal e o eixo HPA tenham sido objeto de pesquisa ao longo dos anos, a natureza desta relação ainda é pouco compreendida. Estudos realizados em ratos expostos a estresse prolongado apresentou aumento nos níveis de secreção de corticosterona, contudo sem modificar os níveis de melatonina circulante, não sendo possível verificar nenhuma evidência de acoplamento fisiológico entre melatonina e glicocorticoides (HAJAK et al., 1997). Em outro modelo experimental indutor de estresse crônico decorrente de injeções de solução salina durante a noite em roedores, constataram uma diminuição da atividade da AANAT e síntese de melatonina (TROIANI et al., 1988), estes mesmos autores sugerem que estas evidências são decorrentes do aumento dos níveis de corticosterona em resposta ao estímulo. O mesmo foi observado em ratos submetidos à contenção por imersão em água, sob esta condição, os roedores apresentaram lesões gástricas e níveis reduzidos de melatonina decorrente desta modalidade de estresse experimental (OTSUKA et al., 2001). Ainda neste mesmo modelo, outros autores detectaram uma redução do número de receptores beta adrenérgicos na glândula pineal, associado a diminuições da atividade da AANAT e síntese de melatonina (YOCCA; FRIEDMAN, 1984).

O ritmo da secreção de corticosterona durante a noite em ratos na glândula adrenal é modulada pelo receptor de melatonina MT1, isoforma mais expressa que apresenta alta afinidade por volta das 22 horas precedendo o pico de melatonina no plasma, estes relatos sugerem que este mecanismo, parece contribuir para a redução deste glicocorticoide (RICHTER et al., 2008). Além disso, foi observado que na glândula adrenal de ratos que apresentaram redução da secreção de melatonina (C57BL), observou-se baixos níveis de proteínas PER1, CRY2 e BMAL1 no córtex da glândula adrenal, sugerindo desta forma que a melatonina pode exercer um controle sobre a ritmicidade do córtex da adrenal, além daquele exercido pelo ACTH (TORRES-FARFAN et al., 2006).

Alguns trabalhos têm demostrado o papel protetor da melatonina em relação aos glicocorticoides. A melatonina in vivo previne os efeitos deletérios induzidos pelos glicocorticoides em ratos, tais como a redução do peso corporal, peso do timo e das adrenais, além da redução dos níveis de glicose no sangue, ácidos graxos, triglicérides e colesterol total (HORI et al., 1984). Ademais, ratos que sofreram pinealectomia apresentaram hipertrofia da

glândula adrenal, este efeito pode ser revertido pela administração da melatonina (VAUGHAN et al., 1972). Ratos machos Sprague-Dawley pinealectomizados mostraram aumento significativo dos níveis de corticosterona, o mesmo padrão foi observado em ratos idosos, sugerindo que um decréscimo relacionado à idade na produção de melatonina pode contribuir para as alterações relacionadas ao envelhecimento sobre o eixo HPA (OXENKRUG et al., 1984).

Ratos tratados com 500µg de dexametasona por 5 dias consecutivamente, apresentaram desregulação do eixo HPA apresentando aumento da secreção adrenocortical ao longo de 24 h. Contudo, a administração de melatonina diminuiu a secreção de corticosterona e aumentou a sensibilidade ao feedback dos glicocorticoides (KONAKCHIEVA et al., 1998). Baxi et al.(2012), avaliou o efeito protetor da melatonina sobre a prole submetida a programação fetal com corticosterona, estes autores observaram que o tratamento com melatonina foi capaz de reverter às alterações desencadeadas pelo uso de corticosterona na prole aos 120 dias de vida.

Ratos no período neonatal que tiveram a glândula pineal incubadas com glicocorticoides apresentaram redução da atividade da AANAT, o mesmo pode ser observado em ratos adultos in vivo (YUWILER, 1989). Em um estudo realizado com indivíduos com hipercortisolismo, observou-se a redução dos níveis de melatonina, os autores sugerem que este fato parece não estar associado apenas ao hipercortisolismo, mas poderia refletir possíveis defeitos intrínsecos na função da glândula pineal que ainda devem ser esclarecidos (DEMITRACK et al., 1990), uma vez que esta glândula possui receptores de glicocorticoides expressos que podem mediar este mecanismo (GRAY; LUTTGE, 1983; SARRIEAU et al., 1988).

Em outra espécie animal, a exemplo de peixes, verificou-se que a dexametasona inibiu a atividade da AANAT na glândula pineal em cultura de maneira dose dependente após 6 horas de exposição e, que a atividade da HIOMT permaneceu inalterada (BENYASSI et al., 2001). Em aves tratadas com dexametasona (4 mg/kg) por 7 dias, observou-se redução da amplitude do ritmo da produção de melatonina na glândula pineal e retina associado a redução da atividade da AANAT (ZAWILSKA; SADOWSKA, 2002). Deixando claro, que independente da espécie estudada, os glicocorticoides podem desencadear efeitos diretos e ou indiretos sobre a via de síntese e secreção de melatonina, sendo possivelmente mediados pelo

elemento responsivo ao glicocorticoide (GRE) localizado na região promotora do gene da AANAT.

Entretanto, alguns estudos realizados em ratos evidenciaram a potencialização da síntese de melatonina noturna tanto em animais perfundidos com corticosterona (FERNANDES et al., 2009) quanto em glândulas pineais isoladas incubadas com corticosterona (FERREIRA et al., 2005). Diante destes trabalhos, deixa claro que os dados encontrados na literatura são contraditórios indicando, desde nenhuma alteração dos níveis de melatonina, a redução dos níveis de melatonina ou mesmo a potencialização da mesma quando exposta a glicocorticoides.

2.5.2 Glicocorticoides e Genes do relógio

Nos últimos anos vários estudos evidenciaram que os osciladores circadianos não residem apenas no núcleo supraquiasmático, mas também na maioria dos tecidos periféricos (Figura 6). De uma forma geral, os glicocorticoides exercem sua ação sobre a expressão dos genes relógio através da interação com seus receptores (GR), estes por sua vez, interagem com o elemento responsivo ao glicocorticoide (GRE) localizado na região promotora dos genes. O GR seria inicialmente acetilado, como consequência, promove mudanças conformacionais capazes de induzir diretamente a transcrição (CHARMANDARI et al., 2011).

Foi detectado em ratos e humanos uma sequência consenso do GRE na região flanqueadora do gene Per1 (HIDA et al., 2000). Balsalobre e colaboradores (2000) demonstraram que a dexametasona induz alterações na expressão dos genes relógio em cultura de fibroblastos, estes mesmos autores detectaram alterações na fase da expressão do gene Per1 em outros tecidos como no fígado, rim, após o tratamento com dexametasona.

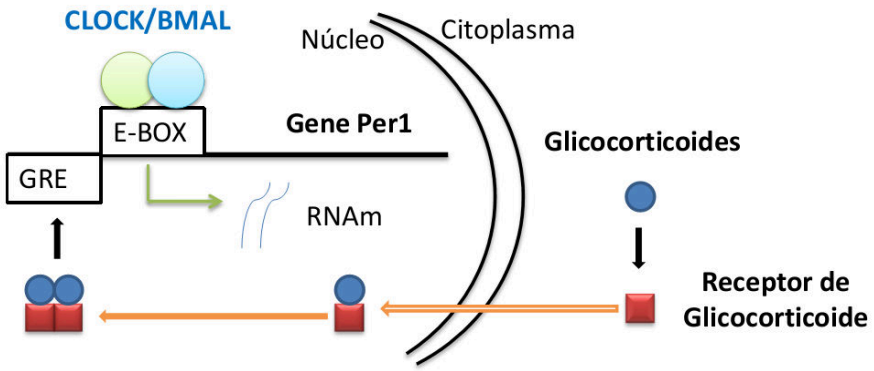


Figura 6: Representação da via de sinalização que conduz a expressão do RNAm através Per1, o elemento de resposta a glicocorticoides (GRE). Modificado DE BURIOKA et al., 2007.

Estudo realizado em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), tais como os monócitos quanto os linfócitos humanos em sistemas in vitro e in vivo, evidenciaram aumento da expressão gênica de hPer1 em resposta a prednisolona (FUKUOKA et al., 2005). Em culturas de células hepáticas (HepG2) incubadas com Prednisolona (0.125µM/hora) verificaram um aumento da expressão dos genes Bmal1 e Per1 de uma maneira dose-dependente, contudo, os níveis de Per2, Cry1 e Rev-*erbα* estavam reduzidos (KOYANAGI et al., 2006). Em outro estudo realizado por Reddy et al.,(2007), observaram que em células hepáticas de ratos tratados com 2 mg/kg de dexametasona apresentaram aumento da expressão do gene Bmal1 e Per1. O tratamento sistêmico de outras espécies apresentaram respostas semelhantes, Yamamoto e colaboradores (2005), por exemplo, demonstraram que ratos submetidos ao estresse por imobilização, apresentaram um rápido aumento nos níveis da expressão de Per1, sugerindo a existência de um GRE funcional na região promotora do gene relógio, estes resultados se devem em parte, a uma possível modulação da transcrição mediada por glicocorticoides cuja concentração plasmática está elevada sob esta condição.

Alterações na expressão do gene relógio parecem desempenhar não apenas um desequilíbrio na ritmicidade hormonal, mas também podem influenciar de forma marcante a regulação do controle glicêmico. Estudo realizado em modelo de camundongos com deleção do gene Per1 ($Per1^{Brd}$), verificou que a ausência deste gene em camundongos causa o aumento da captação e metabolização da glicose, estes efeitos se devem em parte a diminuição do ritmo diário de corticosterona quando comparado ao controle (DALLMANN et al., 2006). Noutro estudo realizado com deleção do gene Per2 ($Per2^{Brdm1}$) em camundongos

tratados com dexametasona (1μM por 2 meses), apresentaram tolerância à glicose semelhantes ao grupo tratado com salina (SO et al., 2009). Tal resultado sugere que a regulação da hiperglicemia induzida por glicocorticoides pode ser dependente de um GRE funcional na região promotora de Per2. Todavia, foi observado nestes animais com a deleção do gene Per2 apresentam ritmo secretório de corticosterona atenuado (YANG et al., 2009). A deleção de outros genes relógio ($Cry1^{-/-}$e $Cry2^{-/-}$) também apresentam alterações significativas na homeostase glicêmica, tais como intolerância a glicose e alta concentração plasmática de corticosterona, sugerindo uma possível repressão do eixo HPA dependente do gene Cry no controle da homeostasia glicêmica corporal (LAMIA et al., 2011). Estas evidências sugerem que tanto CRY1/CRY2 quanto PER1/PER2 parecem exercer papel importante no eixo HPA.

O glicocorticoide sintético dexametasona é capaz de estimular a oscilação transcricional dos genes relógio (Per1, Per2, Cry1, Cry2, Rev-*erbα, Bmal1*) em cultura de células tronco mesenquimais primárias (MSCs) em humanos (SO et al., 2009), estes tipos celulares, quando incubados por um período de 4 horas com glicocorticoide, verificaram que Per1 e Per2 foram hiperexpressos. Lamia et al., (2011) observaram que Cry1 e Cry2 podem interagir com o receptor de glicocorticoides a partir de um GRE na região promotora e pode alterar a resposta transcricional dos glicocorticoides em células embrionárias de ratos, sugerindo que o gene Cry pode regular hormônios esteroides e assim modular ritmos fisiológicos. Além destas evidências, ratos adrenalectomizados apresentaram deslocamento de fase do gene Per1 no fígado e rim (PEZÜK et al., 2012).

Além da modulação dos genes relógio em tecido periférico, alguns estudos em tecido neural têm mostrado que podem ser influenciados pela corticosterona. Estudo recente em que o gene GR foi inativado no núcleo central da amígdala de ratos, promove a atenuação do ritmo diário da proteína PER2, o mesmo não foi observado no núcleo supraquiasmático e amígdala basolateral (SEGALL et al., 2009). É sabido que o tecido neural apresenta dois subtipos de receptores, o receptor para glicocorticoide e o receptor mineralocorticoide, ambos são expressos no cérebro e medeiam os efeitos dos corticosteroides, embora o GR seja o mais ubiquamente expresso (FAN et al., 2005). A expressão do receptor para glicocorticoides é aumentada no início do período de atividade da espécie em questão (KALSBEEK et al., 2012). Apesar destas evidências, não temos conhecimento da modulação dos genes relógio pelos glicocorticoides na glândula pineal de ratos e dos seus efeitos sobre a atividade gênica e suas implicações sobre a síntese e secreção de melatonina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a funcionalidade da glândula pineal e a modulação dos genes relógio em ratos tratados cronicamente com dexametasona.

3.2 Objetivos Específicos

1) Verificar alterações nos parâmetros metabólicos ocasionados pelo tratamento crônico com a dexametasona.

2) Avaliar a secreção da melatonina em glândula pineal de ratos tratados cronicamente com dexametasona.

3) Quantificar a atividade enzimática da arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) em glândula pineal de ratos tratados cronicamente com dexametasona.

4) Avaliar a expressão gênica da *Tph, Hiomt, Aanat, receptor β1*-adrenérgico, adenilato ciclase (AC1), receptor para insulina (Insr) e Glut1 em glândula pineal de ratos tratados cronicamente com dexametasona.

5) Verificar a modulação dos genes relógio (Bmal1, Per1, Per2, Cry1, Cry2 e Rev-*erbα*) em glândula pineal de ratos tratados cronicamente com dexametasona.

4 ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 120 ratos machos Wistar, com 50 a 60 dias de idade com peso corporal entre (200-250 gramas) que foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos à temperatura de 23±2 ºC e ciclo claro/escuro de 12 horas. As luzes foram acessas às 6 horas; Zeitgeber Time ([ZT]0) e apagadas às 18 horas; Zeitgeber time ([ZT]12). Os animais receberam ração comercial (Ração Labina, Presence, São Paulo, SP) e água ad libitum. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de duas semanas nas condições ambientais mencionadas antes do início do protocolo experimental no biotério de manutenção. O projeto foi aprovado previamente ao início dos experimentos pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe (protocolo CEPA nº 54/2009) (Apêndice 1).

4.1 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 2 grupos e tratados conforme descrito abaixo:

1) **Ratos Controle (CON, n=60):** Os animais receberam solução salina 0,9% variando o volume de acordo com o peso corporal (intraperitonialmente) por 10 dias consecutivos.

2) **Ratos Dexametasona (DEX, n=60):** Os animais receberam solução de fosfato de dexametasona (Decadron®, Aché, Guarulhos - SP), na razão de 2mg/kg de peso corporal de animal (intraperitonialmente) por 10 dias consecutivos.

4.2 Tratamento com a dexametasona

Estudos na literatura relatam que 1mg/kg de solução dexametasona por 5 dias intraperitonialmente é suficiente para induzir um quadro de resistência á ação da insulina (Rafacho et al., 2007). Contudo em teste piloto realizado utilizando este protocolo experimental não foi possível verificar um quadro de resistência acentuada nos ratos fornecidos pelo biotério central da UFS (dados divulgados na Fesbe Regional, 2012). Como o trabalho objetivou verificar a funcionalidade da glândula pineal e a modulação dos genes relógio em um rato que apresentasse um quadro de resistência à ação da insulina, o tratamento crônico com 2mg/kg dexametasona por quilo de peso intraperitonialmente, por 10 dias consecutivos foi o mais indicado.

Os animais foram pesados no início do protocolo experimental e distribuídos aleatoriamente para compor os dois grupos de animais. A solução de dexametasona (Decadron®, Aché, Guarulhos – SP) foi injetada intraperitonialmente (ip) no ZT6 do ciclo claro/escuro. Os animais controle receberam intraperitonialmente somente o veículo (solução salina 0,9%) levando em consideração o peso corporal. O peso corporal foi avaliado ao longo do protocolo experimental.

4.3. Perfil diário da glicose plasmática

O perfil diário da glicose plasmática foi determinado em ratos Wistar machos com adaptação de 2 semanas em iluminação artificial com ciclo 12 horas claro/12 horas escuro. Animais de ambos os grupos (CON e DEX), receberam um leve “pique” com seringa estéril com o intuito de se obter uma gota de sangue proveniente do ápice da cauda dos animais de no décimo dia de tratamento. O sangue proveniente da extremidade da cauda foi coletado de ambos os grupos experimentais em intervalos de 1 h, durante o período de 24 h (modificado de MORGAN et al., 1998). A concentração plasmática de glicose foi determinada com o auxílio de glicosímetro (Accu-Chek® Active; Roche Diagnóstica Brasil Ltda. SP).

4.4 Testes de tolerância à insulina - K_{ITT}

O teste de tolerância à insulina (K_{ITT}) foi realizado no ZT2 do ciclo claro/escuro. Para avaliar a sensibilidade à insulina, os ratos foram anestesiados com Thiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira-SP) (40 mg/Kg de peso de animal). Na sequencia foi injetada uma solução de insulina regular (750 mU/mL por Kg de peso de animal) (Humulin R; Eli Lilly, Paris, France) na veia peniana. Amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0 (basal), 4, 8, 12 e 16 minutos após a infusão de insulina e aferida a glicemia plasmática utilizando um glicosímetro (Accu-Chek® Active; Roche Diagnóstica Brasil Ltda.,SP). A constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) foi calculada pela fórmula $0{,}693/t^{½}$, onde $t^{½}$ é o tempo de meia vida da glicose plasmática calculada pela inclinação da curva obtida durante a fase linear de decaimento da glicose plasmática (BONORA et al., 2000; MARÇAL et al., 2012).

4.5 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

O Teste de Tolerância à Glicose (GTT) foi realizado no ZT2 do ciclo claro/escuro. Para avaliar a tolerância à glicose, os ratos foram submetidos a um jejum de 12 h e na sequencia foram anestesiados com Thiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira-SP) (40 mg/Kg de peso de animal, i.p). Os animais receberam uma injeção de solução de glicose (2g por kg de peso corporal) (Isofarma; Isofarma Industrial Farmacêutica Ltda, Eusébio, CE) na veia peniana (modificado de AHRÉN et al., 1999). Amostras de sangue da cauda foram coletadas nos tempos 0 (basal), 1, 5, 20 e 50 minutos após o bolus de glicose e aferidas a glicemia plasmática utilizando um glicosímetro (Accu-Chek® Active; Roche Diagnóstica Brasil Ltda.,SP).

4.6 Procedimento adotado para a retirada de tecido

Os ratos foram eutanasiados por aprofundamento de plano anestésico com thiopental sódico (Thiopentax®, Cristália, Itapira-SP) (40 mg/Kg de peso de animal, i.p). Os animais, (seis por ponto de ambos os grupos) foram sacrificados nos ZT 17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22. A glândula pineal foi retirada no escuro sob luz vermelha. Logo em seguida foram armazenadas à -80 C para posterior processamento. O sangue foi coletado em tubos individuais sendo imediatamente refrigerado (-20 ºC) e na sequencia centrifugado (Hettich Universal 320 Centrifuge; Andreas Hettich GmbH & Co., Tuttlingen, Germany) 1500rpm por 10 minutos à 4 ºC. As amostras de plasma foram coletadas e armazenadas a -80 ºC para avaliação dos níveis de insulina plasmática.

4.7 Dosagem de Insulina por Radioimunoensaio

A concentração de insulina das frações plasmáticas foi determinada por radioimunoensaio (RIA) segundo Boschero e colaboradores (1993) com pequenas modificações. Para isso foram transferidos 0,1 ml das amostras (em duplicata) as quais receberam a seguir 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1: 300,000) e insulina marcada com ^{125}I (traçador, cada tubo recebeu em média 2800cpm) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,1%. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

a) 3 tubos (totais): que receberam somente 0,1 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima;
b) 3 tubos (ligação não específica): contendo 0,1 mL do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,1 mL de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão;
c) 3 tubos (referência): contendo 0,1 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I, 0,2 mL de tampão fosfato com anticorpo anti-insulina e 0,1 mL de tampão fosfato, constituindo assim, o zero de insulina da curva padrão. Em

seguida, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,04; 0,088; 0,17; 0,35; 0,70; 1,41; 2,81; 5,62; 11,25; 22,5; 45 e 90 ng/mL. Cada tubo dessa série recebeu também 0,1 mL de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,2 mL de tampão fosfato contendo anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos (amostras, controle e curva padrão), eles foram agitados em vórtex e estocados a 4 ºC, durante 48 horas.

Após esse período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, os tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5% de carvão ativado (Sigma-Aldrich), 0,1% de albumina e 0,25% de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 30 minutos e a seguir centrifugados por mais 30 minutos (2800 rpm) a 4 ºC. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os três tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos, avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida foi elaborada uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores desconhecidos das amostras. Os resultados foram expressos em ng/mL de insulina secretada durante os experimentos.

4.8 Homeostasis model Assessment (HOMA)

Seis animais de ambos os grupos, foram submetidos a restrição alimentar de 12h, tiveram a glicemia aferida no ZT2 do ciclo claro/escuro e na sequencia foram eutanasiados. Alíquotas de plasma para a determinação da insulina foram colhidas como descrito anteriormente. Foi calculado o índice de HOMA, para avaliar a sensibilidade à insulina através da fórmula: [HOMA:{Insulinemia (µU/mL) x Glicemia (mMol)}/22,5] (GELONEZE; TAMBASCIA,2006).

4.9 Dosagem de melatonina por HPLC

Os níveis de melatonina da glândula pineal de ambos os grupos foram dosadas utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção eletroquímica (UHPLC - Dionex UHPLC Ultimate 3000, Dionex/ESA; WPS-3000TSL). A melatonina foi separada em uma coluna de fase reversa Acclaim RSLC 120 C18 (2,2 um, 120 A, 100 x 2,1 mm). O sistema é controlado pelo programa computacional Chromeleon® Chromatography Data System software.

As glândulas pineais do grupo controle e tratados com dexametasona foram sonicadas (Microson XL 2005; Heat System Inc., Farmingdale, NY, EUA) individualmente em 120 µL de uma solução de ácido perclórico 0,1 M, contendo 0,02% de EDTA e 0,02% de bissulfato de sódio. Em seguida, foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 g (Centrífuga Eppendorf 5415C; Brinkman Instruments Inc., Westbury, NY) e 40 µL do sobrenadante foi injectado no sistema de cromatografia. Como fase móvel foi utilizada uma solução contendo tampão de acetato de sódio 0,1M, 0,1M de ácido cítrico, 0,15 mM de etileno diamina triacético (EDTA), e metanol a 30% (pH 3,7). A cromatografia realizada foi de fase reversa, o sistema foi operado isocraticamente com fluxo de 0,135 mL/min, potencial de oxidação de +750 mV e +700 mV, respectivamente (Modelo ESA ® 5041) e corrida com 7 minutos de duração.

A solução estoque do padrão de melatonina (1mM Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO,EUA) foi preparada em uma solução de HCl 0,1M acrescida de etileno diamina triacético (EDTA) a 0,02% e metabissulfato de sódio 0,02% para obtenção das concentrações desejadas. A melatonina foi quantificada com base em curvas de calibração com 5 concentrações diferentes e conhecidas variando entre 1,74 a 27,84 ng/20µL. As curvas de calibração foram obtidas pelo programa Empower Software (Water Corporation v.5.0) pela relação das concentrações de cada padrão com as áreas dos picos correspondentes.

4.10 Análise radiométrica da atividade enzimática da AANAT

O método da análise radiométrica baseia-se na quantificação da N-[^{3}H]-acetiltriptamina, produto da reação da [^{3}H] acetil-coenzima A ([^{3}H] acetil CoA) e da triptamina, catalizada pela enzima arilalquilamina-N-acetiltransferase (AANAT). O Produto marcado foi extraído em clorofórmio e sua radioatividade foi medida (método desenvolvido por PARFITT et al., 1975, modificado a partir do método de DEGUCHI E AXELROD, 1972).

O procedimento consistiu em adicionar aos tubos de microcentrífuga uma glândula pineal em cada tubo as seguintes substâncias: 25µL de triptamina (40mM) e 25µL de tampão de fosfato de sódio (0,1M, pH 6,8), a 4 ºC. As glândulas pineais na sequência foram sanificadas (Microson XL 2005, Heat System Inc., Farmingdale, NY, USA) com um pulso de 30 segundos para completa destruição do tecido.

Logo em seguida, foram adicionados aos tubos: 25µL de [^{3}H] acetil CoA fria (2mM, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) e 25µL de tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 6,8), a 4ºC. As amostras foram posteriormente agitadas e incubadas em banho seco (Eppendorf Thermomixer, Hamburg, Alemanha) com agitação de 650 rpm, a 37ºC, por 20 minutos. Os tubos foram colocados no gelo para suspender a reação e adicionado 1 mL de clorofórmio saturado com tampão fosfato a cada uma das amostras, o produto foi extraído agitando-se os tubos por 1 minuto.

Para a separação completa das fases aquosas e lipossolúveis, as amostras foram centrifugadas (Epperndorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha) por 1 minuto, a 14.000 rpm, a 4ºC. O sobrenadante foi removido a vácuo e o 200 µL do tampão fosfato foi acrescentado. Novamente as amostras foram agitadas por 1 minuto, centrifugadas por 1 minuto, a 14.000 rpm, a 4ºC, e tiveram as fases aquosas removidas. Na sequencia 500 µL do clorofórmio contendo o produto da reação (^{3}H-N-acetiltriptamina) foi transferido para o tubo de cintilação e colocado para evaporar overnight. O líquido de cintilação 3 mL (“BCS-NA non-aqueous biodegradable counting scintillant”, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA) foi acrescentado e a radioatividade das amostras e dos tubos “branco” (mistura dos reagentes, com exceção do homogenado) foi medida em contador β (LS 6500 Liquid

Scintillation Counter, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Os resultados foram expressos em picomoles de produto formado por glândula pineal por hora.

4.11 Avaliação da Expressão gênica

4.11.1 Extração do RNA total

Para extração do RNA total, cada glândula pineal foi homogeneizada com ajuda de um pistilo em 800 µL de Trizol® (Invitrogem, Carlsbad, CA, EUA). A extração foi feita de acordo com as especificações do fabricante e acrescido 160 µL de clorofórmio (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) para desproteinização por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado por centrifugação (Eppendorf 5804R Centrifuge, Hamburg, Alemanha), 12.000 g, 15 minutos, à 4ºC e o RNA contido na fase aquosa foi transferido para outro tubo e precipitado com 400 µL de isopropanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) e 0,5 µL (10µg) de glicogênio (Roche Applied Science, Indianápolis, IN, EUA).

Após incubação à -20 ºC por até 24 horas, as amostras foram centrifugadas (12.000 g, 10 minutos, 4ºC) para formação do precipitado e o sobrenadante foi descartado. O RNA total precipitado foi lavado com 1 mL de etanol (Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA) 75% e ressuspendido em 15 µL de H_2O deionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

Antes de sua utilização, cada amostra foi quantificada e analisada, quanto à pureza e integridade, por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop^{TM} 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) que analisa 2 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 indicativo da qualidade do RNA extraído. Amostras com razão 260/280 acima de 1,80 foram utilizadas nos procedimentos subsequentes. As amostras foram mantidas à -80 ºC para posterior síntese de cDNA (CARMO BUONFIGLIO,2010).

4.11.2 Obtenção de cDNA

Amostras de 5 µg de RNA total de ambos os grupos experimentais foram submetidas à reação reversa com primers randômicos. Para isto foi adicionado a cada amostra: tapão da enzima (50 mM de Tris-HCL pH 8,3, 75mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$), DDT (10 mM), mistura de dNTPS (10 mM cada), primers randômicos (150ng) e a enzima SuperScript III (200U; Invitrogem, Carlsbad, CA, EUA), em volume final de 20 µL. As reações foram incubadas no termociclador MyGene™ Series Gradiente (LongGene®, China) por 5 minutos à 65ºC, seguida de 10 minutos à 25ºC, com aquecimento para 42ºC por 75 minutos e 70ºC por 15 minutos para desnaturação da enzima. As amostras de cDNA foram armazenadas à -20 ºC.

4.11.3 Análise quantitativa da expressão gênica por PCR em tempo real

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando o aparelho 7500 Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Os ensaios foram realizados utilizando 2µL de cDNA previamente sintetizado, adicionado à mistura da reação contendo 6,25 µL de Power SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, Carlifornia, EUA), 3,25µL de água MiliQ, 0,5 µL de primers sense e antisense específicos para cada gene (Apêndece 2).

Os parâmetros de ciclagem incluíram: inicialmente a etapa de ativação da enzima a 95° C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos incluindo a desnaturação a 95 °C durante 15 segundos; anelamento dos primers e extensão a 60 °C durante 1 minuto. Foi realizado 1 ciclo para a análise do melting que constitui em 95 ºC por 15 segundos; 60ºC por 1 minuto e posterior aumento gradativo da temperatura para 95 ºC para obtenção das curvas melting.

Um conjunto de diluições de 10 vezes em série de cada padrão interno (10^2-10^6 cópias / 2 uL) foi usado para gerar uma curva padrão, e todos os ensaios de qRT-PCR foram lineares dentro deste intervalo de concentrações com coeficientes de correlação (r^2> 0,999).

Números de transcrição foram determinados pelo software 7500, versão 2.0.3 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), e normalizados utilizando a média geométrica calculada a partir da referência de genes ACTB, Rpl37a e Actg1, as quais foram indicadas como as mais adequadas pelo software GeNorm (CARMO-BUONFLIGIO,2010; VANDESOMPELE et al., 2002).

4.12 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste "t" de Student para 2 amostras não pareadas ($p<0,05$);e teste de uma via (One way – ANOVA) e de duas vias (Two way – ANOVA), para mais que 2 variáveis, utilizando para ambos o pós-teste de Bonferroni ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros metabólicos e corporais

O peso corporal dos animais no início do estudo foi similar em ambos os grupos (Tabela 1). Ao final do protocolo experimental o grupo de animais tratados com dexametasona (DEX) apresentaram uma redução do peso corporal significativa quando comparado ao grupo controle ($p<0,001$). Todavia, o tratamento com dexametasona promoveu um aumento significativo do conteúdo do tecido adiposo periepididimal ($p<0,01$).

Tabela 1. Efeitos do tratamento crônico com dexametasona sobre os parâmetros metabólicos e corporais.

Parâmetros	**Grupos**	
	CON	**DEX**
Peso corporal inicial (g)	211,9 ± 3,45	210 ± 4,10
Peso corporal final (g)	229,4 ± 4,46	174,9 ± 3,98***
% de tecido adiposo Periepipididimal	0,63 ± 0,05	0,85 ± 0,03**
Glicemia plasmática (mg/dL)	86,3 ± 2,49	91,6 ± 1,72
Insulina plasmática (ng/dL)	0,65 ± 0,14	5,28 ± 0,23***
HOMA	3,47 ± 0,02	29,8 ± 0,02***

Grupo controle (CON) e tratado com dexametasona (DEX), parâmetros avaliados no décimo dia de tratamento. O peso do tecido adiposo periepididimal foi corrigido pela razão do peso corporal. Valores foram apresentados em média ± erro padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de Student, **p<0,01;***p<0,001 (n=8 para ambos os grupos).

A glicemia de jejum foi avaliada no ZT2 no décimo dia do protocolo experimental após um jejum overnight (Tabela 1), ambos os grupos apresentaram valores similares ($p>0,05$). Todavia, ao avaliarmos a insulina plasmática de jejum dos animais DEX, detectamos um aumento significativo em relação aos animais do grupo CON ($p<0,001$). A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice de HOMA (Tabela 1), e os animais do grupo DEX apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo CON ($p<0,001$) (Tabela 1).

5.2 Perfil diário da glicose plasmática

O perfil diário da glicose plasmática foi avaliado in vivo ao longo de 24 h do ciclo claro/escuro em animais CON e DEX no décimo dia de tratamento (Figura 7). Os níveis de glicose plasmática ao longo do período claro (ZT0 ao ZT12) não apresentaram diferenças significativas entre os animais de ambos os grupos em nenhum dos pontos observados ($p>0,05$). Contudo no período escuro (ZT12 ao ZT24), o grupo DEX apresentou aumento significativo da glicemia plasmática nos ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22 quando comparado ao grupo CON ($p<0,05$).

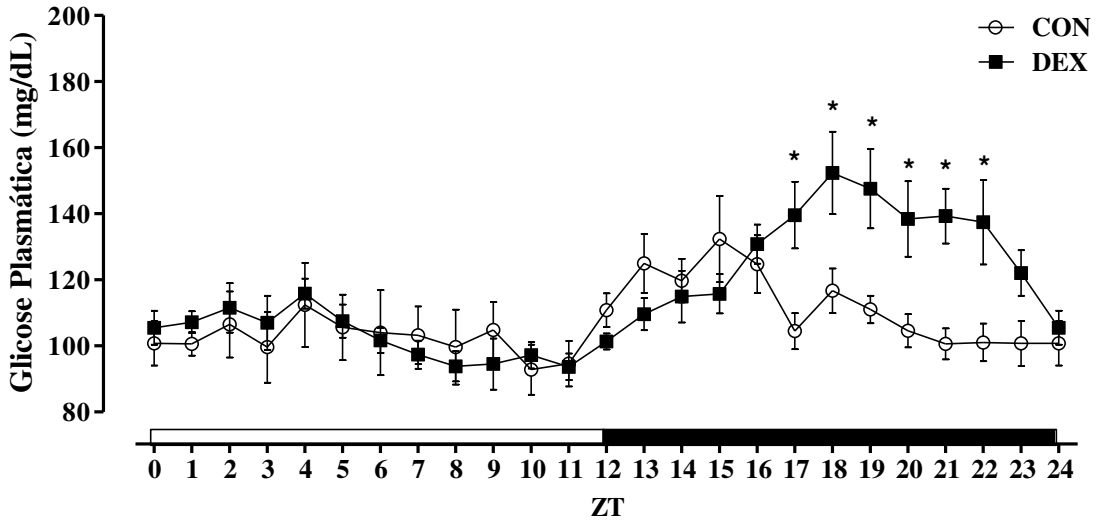


Figura 7: Perfil diário de glicose em ratos Controle (CON) (linhas com círculos abertos) e tratados com dexametasona (DEX) (linhas com quadrados preenchidos). Os valores da ordenada foram expressos em mg/dL, a barra branca e preta da abscissa indicam respectivamente, as fases clara e escura do ciclo claro/escuro, respectivamente. Os resultados foram representados em média ± erro padrão. Two-way ANOVA, utilizando o pós teste de Bonferroni, * $p<0,05$ (n=8 para ambos os grupos).

5.3 Testes de sensibilidade à insulina curto - (K_{ITT})

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado em animais CON e DEX no ZT2. Os animais tiveram a glicemia (tempo zero) aferida antes e após o bolus de insulina nos tempos 4, 8, 12 e 16 minutos (conforme item material e métodos). Os valores da glicemia plasmática foram representados pela velocidade de decaimento da glicose plasmática ao longo do tempo e o K_{ITT} foi calculado. Observou-se que os ratos DEX apresentaram taxa de decaimento da glicose reduzida em relação ao controle (CON 4,62 ± 0,7 vs DEX 1,85 ± 0,4) representando uma diferença significativa ($p<0,01$) (Figura 8).

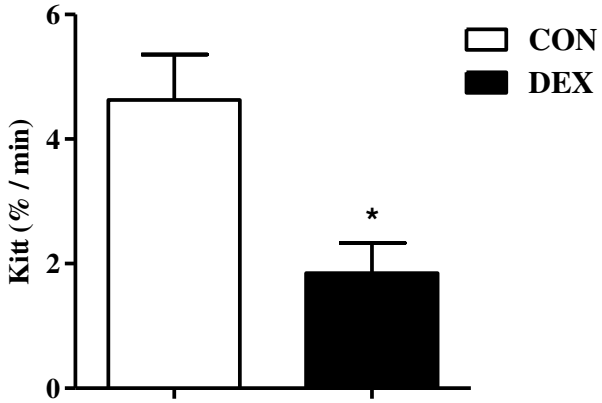


Figura 8: Avaliação da glicemia plasmática durante o teste de sensibilidade à insulina (K_{ITT}) no ZT2. A glicemia de ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os valores da glicemia plasmática foram representados pela velocidade de decaimento da glicose plasmática ao longo do tempo e o K_{ITT} foi calculado. Os resultados foram representados em média ± erro padrão. Teste t de Student's * P<0, 05, (n=8 para ambos os grupos).

5.4 Teste de Tolerância a Glicose (GTT)

Os valores da glicemia plasmática foram representados pelo decaimento de sua concentração ao longo do tempo e pela área sob a curva (Figura 9A e 9B, respectivamente). Como observado, ambos os grupos apresentaram aumento da glicemia plasmática após a infusão da glicose nos tempos 1, 5, 20 e 50 minutos. Todavia, a concentração plasmática de

glicose em ratos tratados com dexametasona foi significativamente maior quando comparado aos animais do grupo controle nos tempos 1, 5 e 20 minutos (Figura 9A). Ademais, a área sob a curva de glicose plasmática apresentou-se maior nos ratos DEX em relação aos animais CON (p<0,05) (Figura 9B).

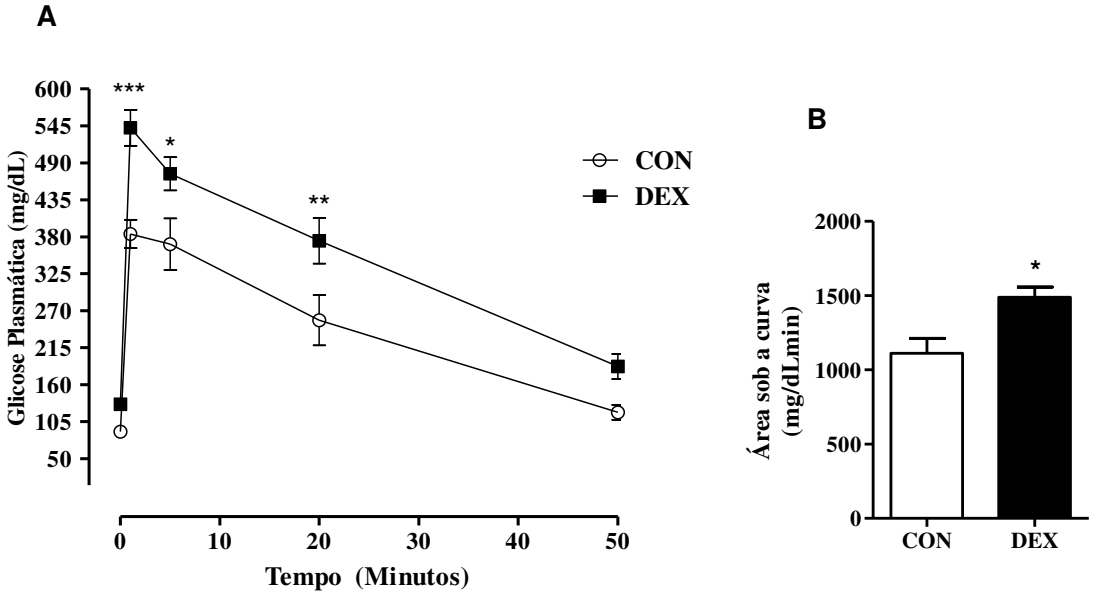


Figura 9: **A** - Avaliação da glicemia plasmática durante o Teste de Tolerância à glicose (GTT) no ZT2. Os resultados foram representados em média ± SEM. Two-way ANOVA, pós-teste de Bonferroni (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001); (n=8 para ambos os grupos). **B -** A área sob a curva do decaimento da glicose foi calculada, os resultados provenientes dos ratos do grupo controle são representados pela barra aberta e tratados com dexametasona pela barra preenchida (Figura 9B), os resultados foram representados em média ± SEM. Teste t de Student's *P<0, 05, (n=8 para ambos os grupos).

5.5 Dosagem de Insulina

Os níveis de insulina plasmática foram avaliados em ratos de ambos os grupos experimentais nos pontos onde o perfil diário da glicose plasmática apresentou-se elevado quando comparado ao grupo controle. Os níveis de insulina plasmática nos animais DEX encontraram-se elevados nos ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22 quando comparados aos animais CON apresentando diferença significativa (p<0,05) (Figura 10).

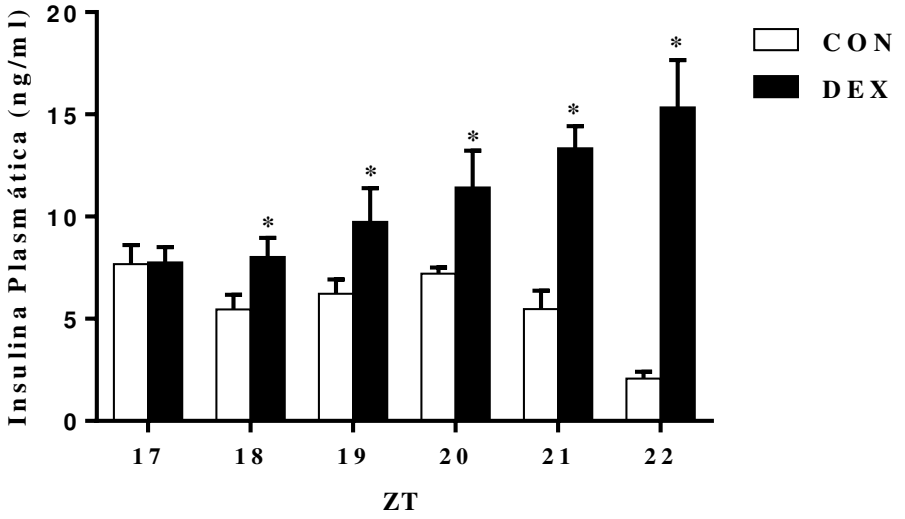


Figura 10: Perfil da insulina plasmática em ratos controles (CON) (linhas com círculos abertos) e tratados com dexametasona (DEX) (linhas com quadrados preenchidos). Os valores da ordenada foram expressos em mg/dL e os abscissa indicam os pontos do ciclo claro/escuro avaliados. Os resultados foram representados em média ± erro padrão. Two-way ANOVA, utilizando o pós teste de Bonferroni, * $p<0,05$ (n=6 para ambos os grupos).

5.6 Dosagem de melatonina

A síntese de melatonina foi determinada nas glândulas pineais de ambos os grupos (ratos controles (CON) e tratadas com dexametasona (DEX)) nos pontos onde o perfil diário da glicose plasmática apresentou-se aumentado quando comparado ao grupo controle (Figura 11). A síntese de melatonina na glândula pineal dos ratos DEX foi reduzida em comparação aos ratos pertencentes ao grupo controle no ZT21 e ZT22 ($p<0,05$). Para os demais ZTs (ZT17, ZT18, ZT19 e ZT20) a concentração de melatonina foram semelhantes em ambos os grupos ($p>0,05$).

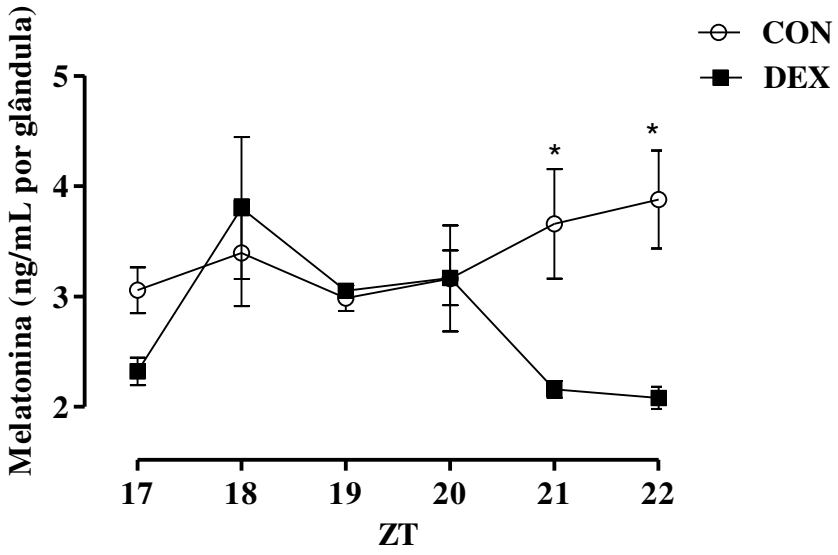


Figura 11: Quantificação de melatonina em ratos Controle (CON) (linhas com círculos abertos) e tratados com dexametasona (DEX) (linhas com quadrados preenchidos). Os valores da quantificação de melatonina estão expressos em ng/glândula e foram representados como a média ± erro padrão. Foi utilizado o Two-way ANOVA, e o pós-teste de Bonferroni, * $p<0,05$ (n=6 para ambos os grupos).

5.7 Atividade da AANAT

A atividade da AANAT foi avaliada nas glândulas pineais de ratos controle e tratados com dexametasona (DEX) no ZT17 ao ZT22 (Figura 12). A atividade da AANAT na glândula pineal dos ratos tratados com dexametasona foi reduzida apenas no ZT21 quando comparada ao grupo controle ($p<0,05$). Para os demais ZTs (ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT22) a atividade da AANAT foi semelhante entre ambos os grupos ($p>0,05$).

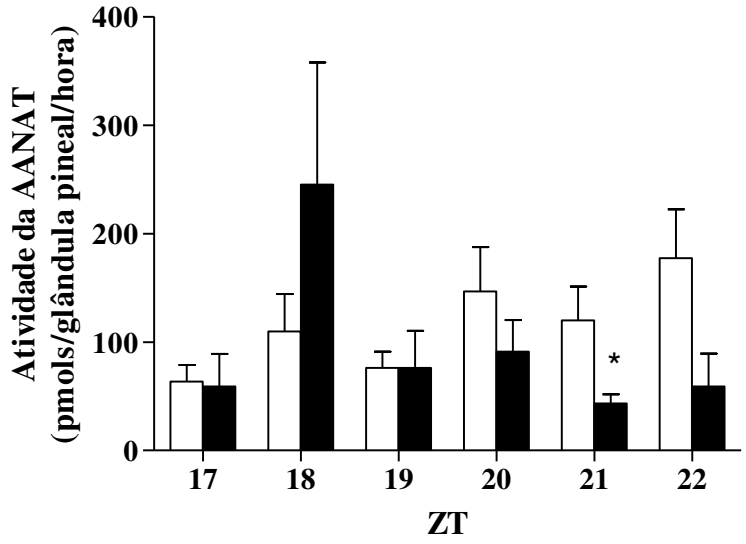


Figura 12: Quantificação da atividade enzimática da AANAT em glândulas pineais de rato. Em ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os valores da atividade da AANAT estão expressos em pmols/glândula/h e os resultados foram representados em média ± SEM., para análise estatística utilizou-se o teste "*t*" de Student, * P<0,05, (n=6 para ambos os grupos).

5.8 Análise da expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina

A expressão do RNAm da Tph, Aanat e Hiomt foram avaliadas em glândulas pineais de ratos controle e tratados com dexametasona, nos ZT17, ZT21 e ZT22, referente ao período em que a síntese de melatonina apresentou redução no grupo tratado com dexametasona. A expressão do RNAm Tph apresentou redução no grupo DEX quando comparado ao grupo controle no ZT22 ($p<0,05$) (Figura 13A). Já a expressão do RNAm da Aanat apresentou valores similares em ambos os grupos em todos os pontos observados (Figura 13B). A expressão do RNAm da Hiomt em pineais de ratos do grupo DEX foi reduzida no ZT21 em comparação ao grupo Controle ($p<0,05$) (Figura 13C).

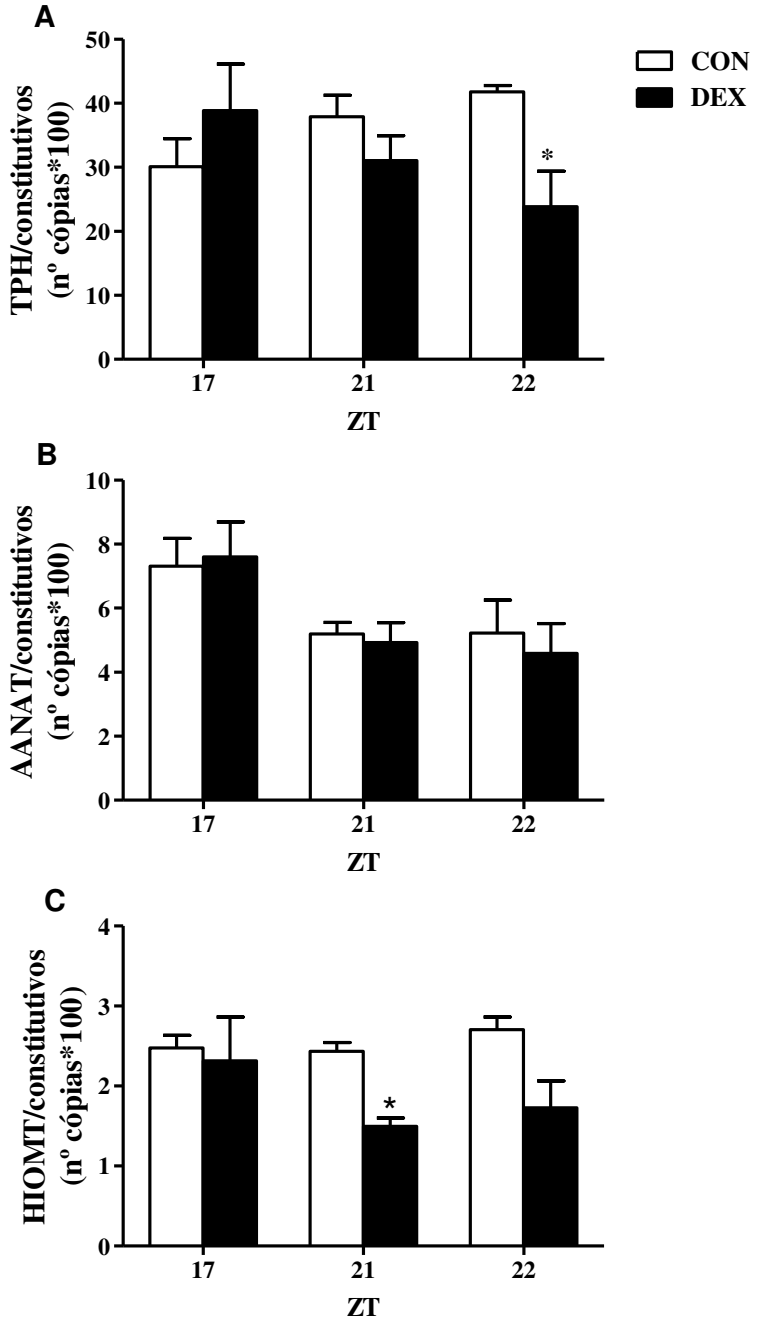


Figura 13: Representação gráfica do RNAm das enzimas envolvidas na síntese de melatonina. A expressão gênica da TPH (Figura **13A**), da AANAT (Figura **13B**) e da HIOMT (Figura **13C**) de glândulas pineais de ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os valores da expressão gênica foram representados em média ± erro padrão, foi utilizado o teste "t" Student, * P<0,05, (n=6 para ambos os grupos).

A expressão do RNAm da adenilato clicase (AC1) e do *receptor β*-adrenérgico apresentaram valores similares entre os grupos de animais tratados com DEX quando comparado ao grupo controle em todos os pontos observados (p>0,05) (Figura 14A-14B).

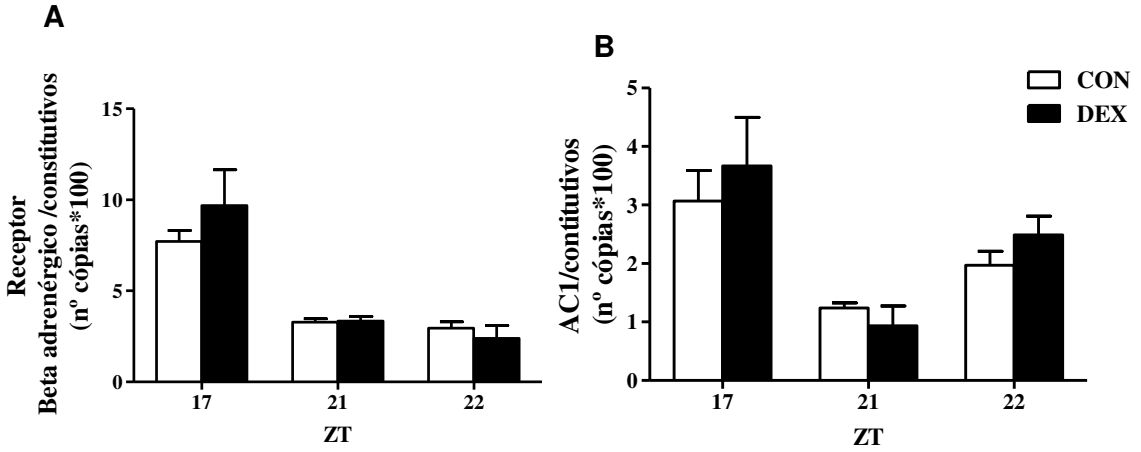


Figura 14: Representação gráfica do RNAm da adenilato clicase (AC1) (Figura **14A**) e do receptor β-adrenérgico (Figura **14B**). A barra aberta representa os resultados da expressão gênica provenientes de pineais dos animais controle, a barra preenchida representa os resultados provenientes dos animais tratados com dexametasona. Os valores da expressão gênica foram representados em média ± erro padrão, foi utilizado o teste "t" Student, * P<0,05, (n=6 para ambos os grupos).

5.9 Expressão gênica dos genes relógio na glândula pineal

A expressão gênica do Bmal1 foi avaliada em glândulas pineais de ratos controle e tratados com dexametasona em ZTs específicos (ZT17, ZT21 e ZT22). A expressão de Bmal1 apresentou-se aumentada nas pineais do grupo DEX nos ZT21 e ZT22, respectivamente, quando comparado ao grupo Controle (p<0,05) (Figura 15A). A expressão do RNAm do Rev-*erbα* foi aumentada no ZT17 em glândulas pineais de ratos tratados com dexametasona quando comparada ao grupo controle (p<0,05) (Figura 15B).

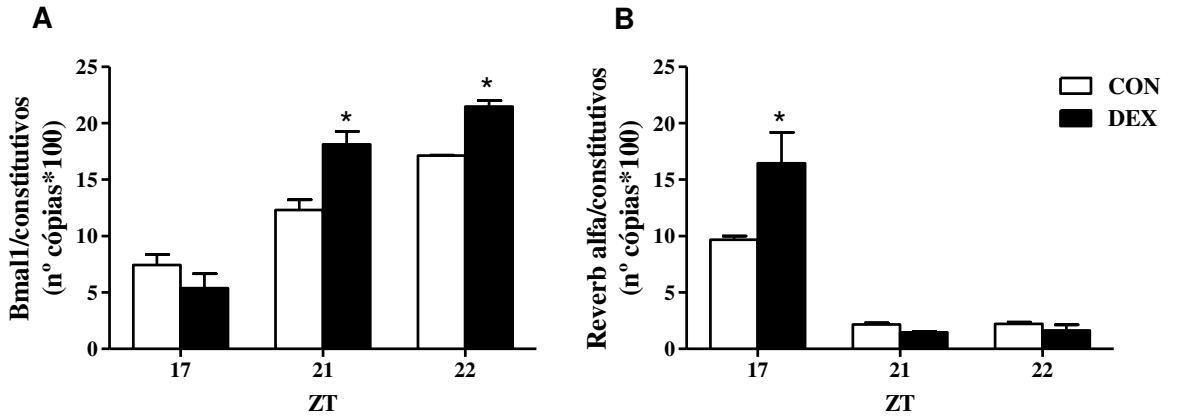


Figura 15: Expressão do RNAm dos genes relógio Bmal1e Rev-erbα em glândulas pineais de ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os animais foram eutanasiados em ZTs específicos (ZT17, ZT21 e ZT22) e tiveram a glândula pineal removida e processada para a extração do RNA total e detecção do RNAm por PCR em tempo real que codificam o Bmal1 (Figura **15A**) e Rev-erbα (Figura **15B**). Os valores da expressão gênica foram representados em média ± erro padrão. Foi utilizado o teste "t" de Student, * P<0,05,(n=6 para ambos os grupos).

A expressão do RNAm do Per1 foi avaliada em pineais de ambos os grupos experimentais, em ratos tratados com dexametasona constatamos um aumento nos ZT17, ZT21 e ZT22 quando comparado ao grupo controle (p<0,05). A expressão do RNAm de Per2 em ratos do grupo DEX foi aumentada em relação ao controle nos períodos correspondentes ao ZT17, ZT21 e ZT22 (p<0,05) (Figura 16B). A expressão gênica do RNAm do Cry1 foi aumentada nas glândulas pineais de ratos pertencentes ao grupo DEX no ZT22 quando comparado ao grupo controle (p<0,05) (Figura 16C). A expressão gênica do Cry2 apresentou aumento da sua expressão nas pineais de ratos tratados com dexametasona no ZT21 quando comparado ao grupo controle (p<0,05) (Figura 16D).

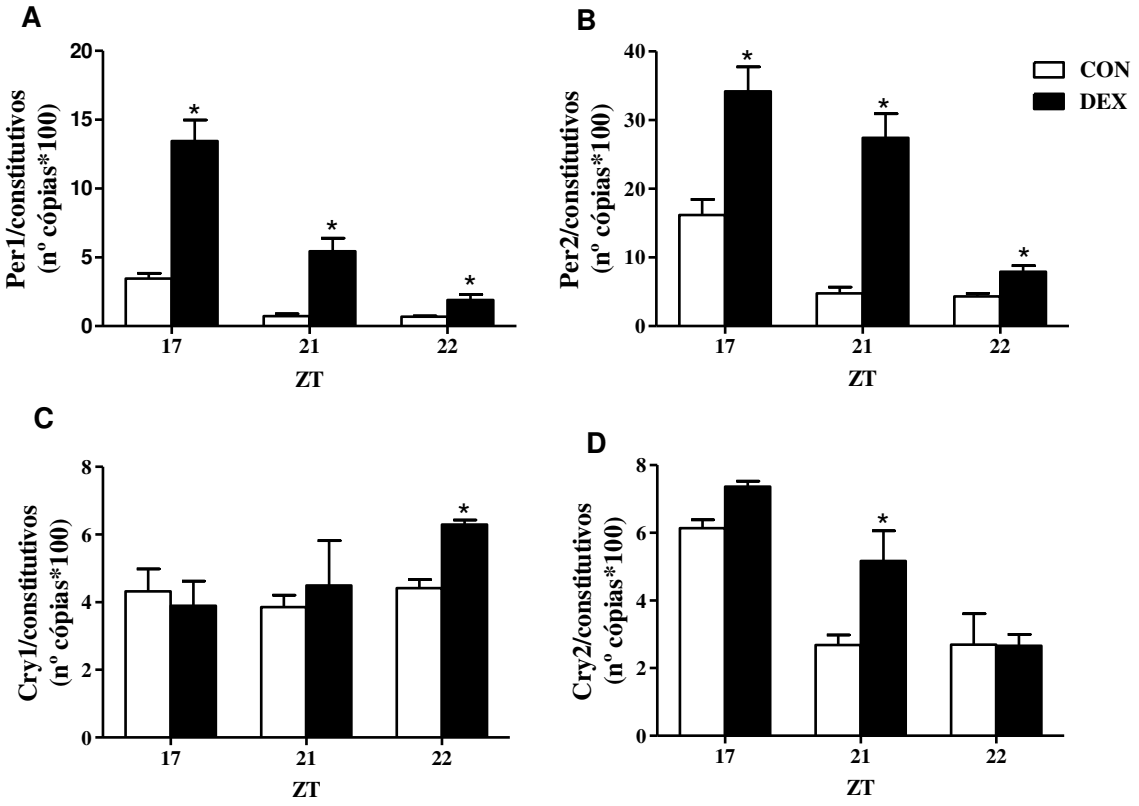


Figura 16: Expressão do RNAm dos genes relógio Per1, Per2, Cry1e Cry2 em glândulas pineais de ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os animais foram eutanasiados em ZTs específicos (ZT17, ZT21 e ZT22) e tiveram a glândula pineal removida e processada para a extração do RNA total e detecção do RNAm por PCR em tempo real: Per1 (Figura **16A**); Per2 (Figura **16B**); Cry1(Figura **16C**) e Cry2 (Figura **16D**). Os valores da expressão gênica foram representados como a média ± erro padrão. Foi utilizado o teste "t" de Student, * P<0,05,(n=6 para ambos os grupos).

5.9.1 Expressão do receptor para insulina (Insr) e Glut1 em glândula pineal de ratos

Foram avaliadas em glândulas pineais de ratos controle e tratados com dexametasona (DEX) em períodos específicos (ZT17, ZT21 e ZT22) a expressão gênica do receptor de insulina (Insr) e da isoforma 1 do transportador para glicose (Glut1). A expressão do RNAm de Insr foi reduzida em glândulas pineais de ratos tratados com dexametasona no ZT21 em relação ao controle (p<0,05) (Figura 17A). Com relação à expressão gênica do Glut1, foi reduzida a expressão gênica nas glândulas pineais pertencentes ao grupo DEX nos ZT21 e ZT22 quando comparado ao grupo controle (p<0,05) (Figura 17B).

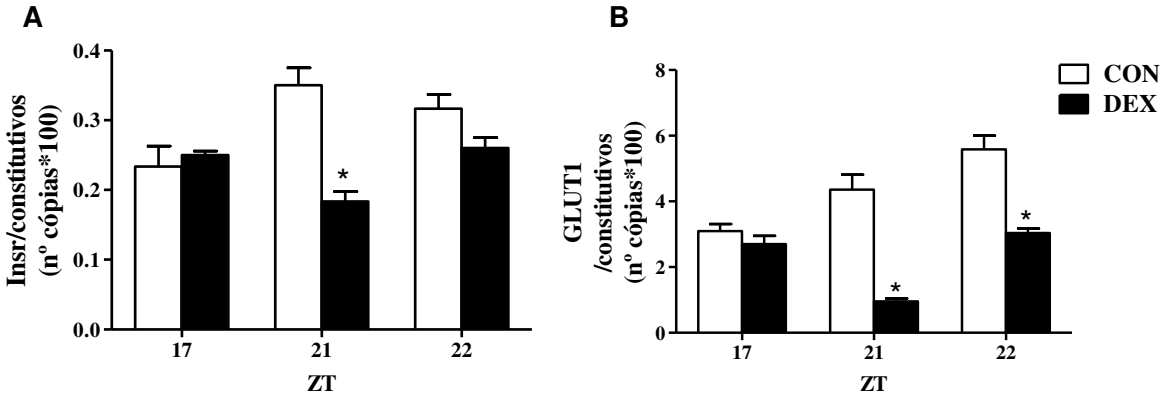


Figura 17: Expressão do RNAm do receptor para insulina (Insr) e transportador de glicose (GLUT1) em glândulas pineais de ratos Controle (barra aberta) e tratados com dexametasona (barra preenchida). Os animais foram eutanasiados nos períodos específicos (ZT17, ZT21 e ZT22) e tiveram a glândula pineal removida e processada para a extração do RNA total e detecção do RNAm por PCR em tempo real: Insr (Figura **17A**) e Glut1 (Figura **17B**). Os valores da expressão gênica foram representados como a média ± erro padrão. Foi utilizado o teste "t" de Student, * P<0,05,(n=6 para ambos os grupos).

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho, animais tratados com dexametasona tiveram uma redução do peso corporal e aumento do tecido adiposo periepididimal. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Rafacho e colaboradores (2008). A redução expressiva de peso dos animais tratados com dexametasona quando comparado ao grupo controle parece estar relacionada com a redução da ingestão de alimento, associados a alterações dos níveis de insulina e leptina no núcleo arqueado do hipotálamo, uma vez que estes dados são consistentes com trabalhos anteriores neste modelo animal (JAHNG et al., 2008; RAFACHO et al., 2008). O aumento do tecido adiposo periepididimal, estar associado à hiperplasia e a hipertrofia decorrentes neste modelo experimental.

Observou-se que os animais tratados com dexametasona apresentaram taxa de decaimento de glicose reduzida em relação ao controle no ZT 2 (Figura 8) e que a amplitude da concentração plasmática de glicose nos animais tratados com dexametasona apresentou-se elevada nos tempos 1, 5 e 20 minutos (Figura 9A), dados ratificados pela área sob a curva que se apresentou maior nos ratos tratados com dexametasona (Figura 9B). Estas evidências sugerem um quadro de sensibilidade à ação da insulina reduzida e de intolerância à glicose como demonstrado por outros autores (SAKODA et al., 2000; RUZZIN et al., 2005).

Nós observamos que o tratamento com dexametasona promoveu aumento da glicemia plasmática, em ambos os grupos no período noturno (Figura 7), sendo que no grupo tratado com dexametasona, o incremento da glicemia foi expressivo quando comparado o grupo controle nos ZT17, ZT18, ZT19, ZT20, ZT21 e ZT22. De uma forma geral, roedores apresentam padrão de atividade noturna, período este em que ocorre a busca pelo alimento e ingestão alimentar, consequentemente, a concentração de glicose plasmática apresentou oscilação no início da noite ocasionado pela alimentação no mesmo período, apresentando uma diminuição ao longo da noite devido à secreção e ação da insulina nos diferentes tecidos periféricos (PENICAUD; LE MAGNEN, 1980; PESCHKE; PESCHKE, 1998). O tratamento crônico com dexametasona pode ocasionar um quadro de hiperglicemia relacionada à redução da captação de glicose para o meio citoplasmático nos tecidos periféricos responsivos a insulina tais como músculo, fígado e tecido adiposo (SAAD et al., 1993; GHOLAP et al., 2005).

A insulina interage com o seu receptor na membrana das células, desencadeando uma série de eventos bioquímicos intracelulares os quais cursam com a translocação para a membrana plasmática da isoforma 4 do transportador de glicose (GLUT4) e consequente captação de glicose do meio extracelular (SESTI, 2006). Em condições de resistência à ação da insulina induzida pelo tratamento com dexametasona, estes efeitos se devem em parte, a uma possível redução da translocação do GLUT4 para a membrana do músculo esquelético como demonstrado por outros autores (GHOLAP et al., 2005). Ademais, autores constataram uma diminuição da sinalização da insulina a jusante de seu receptor tanto em músculo esquelético como também em outros tecidos, a exemplo do adiposo (BURÉN et al., 2002; CAPERUTO et al., 2006). No presente trabalho verificamos no grupo tratado com dexametasona um quadro de tolerância à glicose acentuado no período da noite, que possivelmente, está associado ao quadro de resistência à ação da insulina detectada nestes animais corroborada tanto pelo teste de sensibilidade a insulina (K_{ITT}) quanto pelo índice de HOMA, estes achados estão de acordo com outros autores (SAKODA et al., 2000; RUZZIN et al., 2005).

No presente trabalho, os animais tratados com dexametasona apresentaram um quadro de hiperinsulinemia, isto se deve a um efeito compensatório do pâncreas em resposta a uma elevada concentração de glicose plasmática constatada em animais tratados com glicocorticoide. O aumento da concentração plasmática de glicose promove a secreção de insulina mediada pela estimulação das células beta pancreáticas a secretarem este hormônio (KARLSSON et al., 2001; RAFACHO et al., 2010). Nas fases iniciais da resistência à ação da insulina, a hiperinsulinemia é um fator importante podendo contribuir para o aumento da produção de radicais livres, como consequência, o aumento do estresse oxidativo, um dos possíveis mecanismos que contribuem para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 (CERIELLO; MOTZ, 2004). Por outro lado, a proliferação do número de células beta pancreática pode estar envolvida neste processo, uma vez que, o tratamento com dexametasona promove o aumento da quantidade de ilhotas pancreáticas e de células secretoras de insulina (RAFACHO et al., 2008).

Os níveis de glicose e insulina, assim como de outros hormônios (adrenocorticotrófico, prolactina, cortisol e melatonina) são regulados por osciladores circadianos (HAUS, 2007), responsáveis pela regulação de vários processos metabólicos. Possíveis desequilíbrios no sistema circadiano podem ocasionar o desenvolvimento de

doenças metabólicas, a exemplo disso, a obesidade, o diabetes e doenças cardiovasculares (BUXTON et al., 2010; SCHEER et al., 2009). O relógio mestre, localizado no NSQ do hipotálamo, é autossustentado podendo ser modulado por variações de temperatura, exposição à luz, estes estímulos externos, por sua vez, podem ser considerados como reguladores do "sinal de saída" ou liberação de hormônios e/ou também de respostas comportamentais a exemplo da sazonalidade (HASTINGS et al., 2003; KWON et al., 2011).

A biossíntese da melatonina na glândula pineal é considerada um sinal de saída mediado pelo sistema circadiano (BELL-PEDERSEN et al., 2005). Além disso, a melatonina exerce um papel importante no metabolismo da glicose, uma vez que foi demonstrado que ratos pinealectonizados apresentam ritmo de secreção de insulina alterado (PICINATO et al., 2002), desta forma, este hormônio parece atuar na sincronização dos orgãos relacionados à regulação da glicose plasmática assim como evidenciado por outros autores (MUHLBAUER et al., 2009; PICINATO et al., 2002). Em condições patológicas, a exemplo do diabetes mellitus experimental induzida com estreptozotocina (STEBELOVÁ et al., 2007), ratos diabéticos Goto Kakizaki (FRASE et al., 2009) e em pacientes diabéticos mellitus 2 (PESCHKE et al., 2006) apresentaram uma redução da melatonina circulante, reforçando o hipótese de que este hormônio está envolvido no controle glicêmico corporal.

No presente trabalho, a expressão gênica do receptor para insulina (Insr) e o Glut1 em glândulas pineais de ratos tratados com dexametasona foi alterada, exatamente nos pontos onde as glândulas pineais de animais do grupo DEX apresentaram redução da síntese de melatonina, bem como um quadro de hiperinsulenemia e hiperglicemia. Nossos dados sugerem uma possível inter-relação entre a sinalização do receptor para insulina e a secreção de melatonina mediada pela glândula pineal. Trabalhos anteriores revelaram a presença de proteínas envolvidas na via de sinalização do IR/IGF1-R e de proteínas a jusante desta via (IRS-1, IRS-2, IRβ, IGF-1R, e p85 subunidade da PI3K). Glândulas pineais de ratos quando incubadas com insulina apresentaram um aumento na síntese de melatonina (PELICIARI-GARCIA et al., 2010). Estes efeitos se devem em parte, a um aumento da atividade da PI3K, uma vez que glândulas pineais quando incubadas com LY 294002 (bloqueador farmacológico da PI3K) apresentaram redução da síntese de melatonina e da atividade da AANAT (PELICIARI-GARCIA et al., 2010) demonstrando que a via de sinalização da insulina na glândula pineal pode potencializar a síntese de melatonina.

Na tentativa de elucidar por qual mecanismo o glicocorticoide pode estar induzindo alterações na concentração de melatonina verificamos a expressão gênica das principais enzimas envolvidas na síntese de melatonina (Tph, Hiomt e Aanat) em pineais isoladas de ratos tratados com dexametasona. Observamos que as expressões gênicas da TPH e HIOMT são reduzidas no ZT22 e ZT21 respectivamente. Embora o nível de transcrição da Tph tenha apresentado redução no ZT22, à expressão gênica da Aanat em pineais de ratos tratados com dexametasona não apresentou alteração em relação ao grupo controle. Sabe-se que a TPH catalisa a transformação do animoácido triptofano em serotonina (5-hidroxitriptofano, 5-HT) (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003), esta por sua vez dá origem aos substratos da AANAT e da HIOMT (ARENDT, 1998). Esses achados diferem dos encontrados por Clark e Russo (1997), em que a transcrição gênica da TPH foi aumentada na glândula pineal. Contudo, a regulação pós-traducional da TPH parece ser mais importante do que a ativação transcricional na formação da serotonina (HUANG et al., 2008).

É sabido que a HIOMT no período noturno é estimulada por receptores β1-adrenérgicos, que por sua vez promove o aumento do AMPc resultando na fosforilação de CREB e aumento da expressão do gene da Hiomt (RIBELAYGA et al., 1999). No presente trabalho, a expressão gênica do *receptor β*-adrenérgico, bem como, da adenilato ciclase (AC1), estavam inalterados nos pontos observados. A adenilato cicclase auxilia na regulação dos níveis de Ca^{2+} estimulando o aumento nos níveis do AMPc (TOSINI; FUKUHARA, 2002), é estabelecido que os níveis elevados de AMPc ativa PKA, que por sua vez fosforila CREB, estes eventos cursam com a aumento da transcrição gênica das enzimas envolvidas na síntese de melatonina. No presente trabalho a via do AMPc/CREB não foi avaliada, contudo parecer estar inalterada, logo que os níveis de transcrição das enzimas envolvidas na síntese de melatonina não foram alterados.

Estudos em ratos submetidos a estresse crônico observaram a redução dos níveis de melatonina plasmática associada a uma redução da atividade da AANAT (OTSUKA et al., 2001; TROIANI et al., 1988). Resultados similares foram demonstrados em glândulas pineais em cultura quando incubadas com glicocorticoides, apresentando redução dos níveis de melatonina e atividade da AANAT associados à redução dos receptores β1-adrenérgico (DEMITRACK ET AL., 1990; YOCCA; FRIEDMAN, 1984). Além destas evidências, Zhao e Touitou (1993), constataram uma redução da formação de melatonina em ratos perfundidos com dexametasona. Os glicocorticoides exercem seus efeitos mediado pela ativação de seus

receptores (GR) ubiquamente expressos em vários tipos celulares (CHROUSOS et al., 2005), sendo capazes de modular positivamente ou negativamente a expressão de genes relógio através da ativação de receptores de glicocorticoides, que por sua vez interagem com o elemento responsivo a glicocorticoides (GREs), localizados na região promotora dos genes (CHARMANDARI et al., 2011; DICKMEIS, 2009). Além disso, estudos recentes tem demonstrado que os glicocorticoides modulam a ritmicidade dos genes relógio em diferentes tecidos periféricos (BALSALOBRE et al., 2000).

Sabe-se que o gene da Aanat e AC1 além de possuir em sua região promotora o elemento de resposta ao AMPc, também possui um E-box em sua região promotora (CHEN; BALER, 2000; BALER et al., 1997), assim sendo, a transcrição da AANAT pode ser regulada via ação heterodímero CLOCK/BMAL1 (TOSINI, FUKUHARA, 2002). No presente trabalho, verificamos a expressão gênica dos principais genes relógio na glândula pineal de retos tratados com dexametasona. Constatamos um aumento na expressão gênica de Bmal1 durante a noite nos animais tratados com dexametasona. Estudos têm demonstrado que a dexamatasona é capaz de estimular a oscilação transcricional de vários componentes dos genes relógio como Bmal1, Npos2, Per1, Per2, Cry1, Cr2, Rev-*erbα* e Rev-*erbβ* em cultura de células-tronco mesênquimais (MSCs) (SO et al., 2009). Concordando com esse achado, estudo realizado com células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSCs) de ratos e humanas in vitro quando expostas a dexametasona, também apresentaram alteração do padrão oscilatório na expressão do RNAm dos genes relógio (BALSALOBRE et al., 2000; WU et al., 2008).

Nossos dados são concordantes com estes autores, visto que os níveis da expressão dos genes relógio Per1 e Per2 encontraram-se aumentados em glândulas pineais de ratos tratados com dexametasona de forma robusta quando comparado ao grupo controle. Estudo realizado em células hepáticas (HepG2) com a prednisolona, um glicocorticoide com menor potencial de ação, observou aumento nos níveis de expressão do RNAm dos genes Per1 e Bmal1. Além disso, o gene Per1 na sua região promotora apresenta um GRE funcional, sendo que os glicocorticoides induz um rápido aumento na expressão gênica do Per1 (YAMAMOTO et al., 2005). Estes eventos cursam com a repressão da transactivação do heterodímero CLOCK/BMAL1, e consequentemente, pode promover a redução transcricional dos genes Per2 e Rev-erbα (KAYANAGI et al., 2006). Além da via CREB/CRE (estimulada pela variação fótica) e do relógio CLOCK/BMAL1 (via E-box), o controle da transcrição do

gene Per1, desencadeado pelos glicocorticoides, pode ser considerada uma terceira via, esta regulada por um GRE funcional (YAMAMOTO et al., 2005).

Todavia, é sabido que o gene Per1 assim como a AANAT são modulados pela concentração de AMPc, o qual desempenha um papel central na oscilação do relógio na glândula pineal do rato (KAROLCZAK et al., 2004; VON GALL et al., 2001). Partindo destas evidências, embora no presente trabalho, os níveis de AMPc e a quantificação da CREB não tenha sido realizados, sugere-se que esta via esteja inicialmente inalterada. Sugerindo desta forma que a regulação do gene Per1 na glândula pineal esteja relacionada a um GRE funcional. Tal hipótese pode ser estendida a outros genes relógio, visto que, além de Per1, os glicocorticoides são capazes de estimular a expressão gênica de Per2, Cry1, Cry2 e Rev-*erbα* em cultura de células dependentes da ativação do GRE funcional (LAMIA et al, 2011; SO et al., 2009). No presente trabalho, o nível da expressão do Rev-*erbα* foi aumentado no ZT17, embora não foi possível observar níveis reduzidos do Bmal1 neste mesmo ZT. É sabido que o Rev-*erbα* participar da retroalimentação secundária, competindo assim, pela ligação ao elemento ROR (RORE) na região promotora de Bmal1, envolvido na inibição da expressão da proteína BMAL1 (ALBRECHT; EICHELE, 2003; SATO et al., 2004), contudo no presente trabalho não foi possivel observar esta relação. Além disso, outros autores verificaram em cultura de hepatócitos primários de ratos e em humanos que o tratamento com glicocorticoides pode atenuar a expressão de Rev-*erbα,* mediada por receptor de glicocorticoides (GR) (KAYANAGI et al., 2006; TORRA et al., 2000), fato que não foi observado no presente trabalho. Embora o tratamento com dexametasona tenha modulado a expressão gênica dos genes relógio na glândula pineal, a expressão gênica da AANAT foi inalterada, indicando que a redução da atividade da AANAT ocorreu por mecanismos pós-transcricionais.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, este trabalho evidencia que o tratamento com dexametasona induz um quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia acentuado durante o período noturno, resultando na diminuição da expressão dos receptores para insulina e de Glut1 na glândula pineal. Além disso, o tratamento com glicocorticoide é capaz de diminuir a secreção de melatonina e a atividade da AANAT possivelmente por mecanismos pós-transcricionais. Ademais, os animais tratados com dexametasona apresentaram aumento da expressão de Bmal1, Per1, Per2, Cry1, Cry2 e Rev-*erbα*, possivelmente pela presença de um GRE funcional na região promotora desses genes, sem, contudo, alterar a expressão gênica da AANAT.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; HERZOG, E.D.; YAMAZAKI, S.; STRAUME, M.; TEI, H.; SAKAKI, Y.; MENAKER, M.; BLOCK, G.D. Circadian rhythms in isolated brain regions. **J Neurosci,** 22,350–356,2002.

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,** 52,203–210, 2012.

AHRÉN, B.;SAUERBERG, P.; THOMSEN, C.Increased insulin secretion and normalization of glucose tolerance by cholinergic agonism in high fat-fed mice. **Am J Physiol,** 277(40), E93-E102, 1999.

ALBRECHT, U.; ZHENG, B.; LARKIN, D.; SUN, Z.S.; LEE, C.C. Are mPer1 and mPer2 Are Essential for Normal Resetting of the Circadian Clock. **J Biol Rhythms,** 16,100 -104, 2001.

ALBRECHT, U.;EICHELE, G.The mammalian circadian clock.**Curr Opin Genet Dev,** 13,271–277, 2003.

ALOYO, V.J.;WALKER, R.F. Noradrenergic stimulation pineal glands in vitro. **J.Endocr,** 112, 3-9,1987.

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

APPELBAUM, L.; VALLONE, D.; ANZULOVICH, A.; ZIV, L.; TOM, M.; FOULKES, N.S.; GOTHILF, Y. Zebrafish arylalkylamine-**N**-acetyltransferase genes – targets for regulation of the circadian clock .**J Mol Endocrinol, 36, 337-347, 2006.**

ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Reviews of Reproduction,** 3,13–22, 1998.

ARENDT, J.Melatonin and the Mammalian Pineal Gland.**Chapman and Hall,** London, 1995.

ARIËNS-KAPPERS, J. Short history of pineal discovery and research. In Ariëns-Kappers J, Pévet P, eds.The pineal gland of vertebrates including man. **Progress in Brain Research, 52,**.1-22,1979.

AUCLAIR, D.; GARREL, D.R.; ZEROUALA, A.C.; FERLAND, L.H. Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids. **Am J Physiol Cell Physiol,** 272, C1007–C1016, 1997.

AXELROD, J.; WCRTMAX, R.J.; SNYDER, S.H. Control of Hydroxyindole 0-Methyltransferase Activity in the Rat Pineal Gland by Environmental Lighting. **J Biol Chem,** 240(2),949-954, 1965.

AXELROD, J.; SHEIN, H.M.; WURTMAN, R.J. Stimulation of c14-melatonin synthesis from c14-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. **Proc Natl Acad Sci**, 62,544-54, 1969.

AXELROD, J.; WEISSBACH, H. Purification and proper-ties of hydroxyindole-O-methyltransferase. **J Biol Chem**, 236,211-213, 1961.

BAILEY, M.J.; COON, S.L.; CARTER, D.A.; HUMPHRIES, A.; KIM, J.S.; SHI, Q.; et al. Night/day changes in pineal expression of >600 genes: central role of adrenergic/cAMP signaling. **J Biol Chem,** 20, 284(12), 7606-22, 2009.

BALER, R.; COVINGTON, S.; KLEIN, D.C.The rat arylalkylamine N-acetyltransfersae gene promoter. **J Biol Chem,** 272(11), 6979-6985, 1997.

BALSALOBRE, A.; BROWN, S.A.; MARCACCI, L.; TRONCHE, F.; KELLENDONK, C.; REICHARDT, H.M.; SCHUTZ, G.; SCHIBLER, U. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. **Science,** 289,2344–2347, 2000.

BAXI, D.B.; SINGH, P.K.; VACHHRAJANI, K.D.; RAMACHANDRAN, A.V. Neonatal corticosterone programs for thrifty phenotype adult diabetic manifestations and oxidative stress: countering effect of melatonin as a deprogrammer. **J Matern Fetal Neonatal Med,** 25(9):1574-85, 2012.

BELL-PEDERSEN, D.; CASSONE, V.M.; EARNEST, D.J.; GOLDEN, S.S.; HARDIN, P.E.; THOMAS, T.L.; ZORAN, M.J. Circadian rhythms from multiple oscillators:lessons from diverse organisms. **Nat Rev Genet,** 6(7), 544–556, 2005.

BENYASSI, A.; SCHWARTZ, C.; DUCOURET, B.; FALCO, J. Glucocorticoid receptors and serotoninN-acetyltransferase activity in the fish pineal organ. **NeuroReport,** 12(5), 889-892, 2001.

BONORA, E.; TARGHER, B.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R.C.; SAGGIANI, F.; ZENERE, M.B.; MONAUNI, T.; MUGGE, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. **Diabetes Care,** 23,57-63, 2000.

BORJIGIN, J.; LI, X.; SNYDER, S.H.The pineal gland and melatonin: Molecular and Pharmacologic Regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol,** 39,53–65, 1999.

BOUMPAS, D.T.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; CUPPS, T.R.; BALOW, G.E. Glucocorticoids therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. **Ann Int Med**, 119,1198-1208, 1993.

BUCKINGHAM, J.C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. **British J. Pharmacology,** 147,S258–S268, 2006.

BURÉN, J.; LAI, Y.C.; LUNDGREN, M.; ERIKSSON, J.W.; JENSEN, J. Insulin action and signaling in fat and muscle from dexamethasone-treated rats. **Arch Biochem Biophys,** 474,91-101, 2008.

BURÉN, J.; LIU, H.X.; JENSEN, J.; ERIKSSON, J.W.Dexamethasone impairs insulin signalling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. **Eur J Endocrinol,** 146(3), 419-29, 2002.

BURIOKA, N.; FUKUOKA, Y.; TAKATA, M.; ENDO, M.; MIYATA, M.; et al. Circadian Rhythms in the CNS and Peripheral Clock Disorders: Function of Clock Genes: Influence of Medication for Bronchial Asthma on Circadian Gene. **J Pharmacol Sci,** 103, 144 – 149, 2007.

BURNS, R.E.; SATEIA, M.J.; LEE-CHIONG, T.L. Basic Principles of Chronobiology and Disorders of Circadian Sleep-Wake Rhythm.In:Lee-Chiong TL, Sateia MJ, Carskadon MA, eds, **Sleep Medicine**, 1st edition: Philadelphia: Hanley & Belfus, Inc.,245-252,2002.

BUXTON, O.M.; PAVLOVA, M.; REID, E.W.; WANG, W.; SIMONSON, D.C.; ADLER, G.K.Sleep restriction for 1 week reduces insulin sensitivity in healthy men.**Diabetes,** 59,2126–2133, 2010.

CAPERUTO, L.C.; ANHÊ, G.F.; AMANSQ, A.M.; RIBEIRO, L.M.; MEDINA, M.C.; SOUZA, L.C.; CARVALHO, O.M.; BORDIN, S.; SAAD, M.J.; CARVALHO, C.R. Distinct regulation of IRS proteins in adipose tissue from obese aged and dexamethasone-treated rats. **Endocrine**, 29(3), 391-8, 2006.

CARMO BUOFIGLIO, D.; PELICIARI-GARCIA, R.A.; AMARAL, F.G.D.; PERES, R.; NOGUEIRA, T.C.A.; AFECHE, S.C.; CIPOLLA-NETO, J. Early-stage retinal melatonin synthesis impairment in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Investigative ophthalmology & Visual Science,** 52,7416-7422, 2011.

CARMO BUONFIGLIO, D. **Estudo da síntese de melatonina em retinas de ratos Wistar diabéticos**, 2010, Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

CEINOSA, R.M.; CHANSARD, M.; REVEL,F.; CALGARI, C.; MÍGUEZ, J.M.; SIMONNEAUXB,V. Analysis of Adrenergic Regulation of Melatonin Synthesis in Siberian Hamster Pineal Emphasizes the Role of HIOMT**. Neurosignals,**13(6), 308–317,2004.

CERIELLO, A.; MOTZ, E. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** 24,816–823,2004.

CHALLET, E. Minireview: Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals. **Endocrinology,** 148(12), 5648–5655, 2007.

CHAMPNEY, T.H.; CRAFT, C.M.; WEBB, S.M.; REITER, R.J. Hormonal modulation of pineal melatonin synthesis in rats and Syrian hamsters: effects of adrenalectomy and corticosteroid implants. **J Neural Transm,** 64(1), 67-79, 1985.

CHAN, G.C.; LERNMARK, U.; XIA, Z.; STORM, D.R. DNA elements of the type 1 adenylyl cyclase gene locus enhance reporter gene expression in neurons and pinealocytes. **Eur J Neurosci,** 13, 2054-2066, 2001.

CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G.P.; LAMBROU, G.I.; PAVLAKI, A.; KOIDE, H. Peripheral CLOCK Regulates Target-Tissue Glucocorticoid Receptor Transcriptional Activity in a Circadian Fashion in Man. **PLoS One,** 6(9), e25612, 2011.

CHATTORAJ, A.; LIU, T.; ZHANG, L.M.; HUANG, Z.; BORJIGIN, J. Melatonin formation in mammals:In vivo perspectives**. Rev Endocr Metab Disord,** 10,237–243,2009.

CHEN, W.; BALER, R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: different use in a master vs. slave oscillator. **Mol Brain Res,** 81:43-50, 2000.

CHRIST-CRAIN, M.; KOLA, B.; LOLLI, F.; FEKETE, C.; SEBOEK, D.; WITTMANN, G.; et al. AMP-activated protein kinase mediates glucocorticoid-induced metabolic changes: a novel mechanism in Cushing's syndrome. **FASEB J,** 22(6),1672-83, 2008.

CHROUSOS, G.P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **N Engl J Med,** 332(20),1351–1362,1995.

CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders. **Stress,** 10,213–219, 2007.

CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. **Sci STKE,** pe48, 2005.

CIPOLLA-NETO, J.; BARTOL, I.; SERAPHIM, P.M.; AFECHE, S.C.; SCIALFA, J.H.; PERACOLI, A.M.The effects of lesions of the thalamic intergeniculate leaflet on the pineal metabolism. **Brain Res,** 691,133–141, 1995.

CLARK, M.S.; RUSSO, A.F. Tissue-specific glucocorticoid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA levels.**Molecular Brain Research,** 48:346–354, 1997.

CUESTA, S.; KIREEV, R.; GARCÍA, C.; RANCAN, L.; VARA, E.; TRESGUERRES, J.A.F. Melatonin can improve insulin resistance and aging-induced pancreas alterations in senescence-accelerated prone male mice (SAMP8). **Age (Dordr),** DOI: 10.1007/s11357-012-9397-7, 2012.

DALLMANN, R.; TOUMA, C.; PALME, R.; ALBRECHT, U.; STEINLECHNER, S. Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per1 (Brd) mice. **J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol,** 192(7),769-775, 2006.

DAMITRACK, M.A, LEWRY, A.J.; REUS, V.I. Pineal-adrenal interactions: the effect of acute pharmacological blockade of nocturnal melatonin secretion. **Psychiatry Res,** 32(2),183-9, 1990.

DARDENTE, H., MENET, J.S.; POIREL, V.J.; STREICHER, D.; GAUER, F.; VIVIEN-ROELS, B.; KLOSEN, P.; PEVET, P.; MASSON-PEVET, M. Melatonin induces Cry1 expression in the pars tuberalis of the rat. **Brain Res Mol Brain Res,**114, 101–106, 2003.

DAVIDSON, A.J.; YAMAZAKI, S.; ARBLE, D.M.; MENAKER, M.; BLOCK, G.D. Resetting of central and peripheral circadian oscillators in aged rats. **Science,** 288(5466), 682–685, 2000.

DE PAULA, F.M.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; BOSQUEIRO, J.R.; RAFACHO, A. Insulin signaling proteins in pancreatic islets of insulin-resistant rats induced by glucocorticoid**, Biol Res,** 44(3), 251-7, 2011.

DEFRONZO, R.A.; FERRENNINI, E. Insulin resistance: A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. **Diabetes Care,**14,173-194,1991.

DEGUCHI, T.; AXELROD, J. Sensitive assay for serotonin N-acetyltransferase activity in rat pineal.**Anal Biochem**, 50, 174–179, 1972.

DEMISCH, L.; DEMISCH, K.; NICKELSEN, T. Influence of dexamethasone on nocturnal melatonin production in healthy adult subjects. **J Pineal Res,** 5(3),317-22, 1998.

DICKMEIS, T. Glucocorticoids and the circadian clock. **J Endocrinol,** 200, 3-22, 2009.

DICKMEIS, T.; LAHIRI, K.; NICA, G.; VALLONE, D.; SANTORIELLO, C.; et al. Glucocorticoids Play a Key Role in Circadian Cell Cycle Rhythms. **PLoS Biol,** 5(4): e78, 2007.

DIVERTIE, G.D.; JENSEN, M.D.; MILES, J.M. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. **Diabetes,** 40, 1228-32, 1991.

DUBOCOVICH, M.L.; RIVERA-BERMUDEZ, M.A.; GERDIN, M.J.; MASANA, M.I. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Front Biosci,** 8, d1093– d1108, 2003.

DUEZ, H.; STAELS, B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. **Diab Vasc Dis Res,** 5(2), 82-8, 2008.
DUNLAP, J.C. Molecular Bases for Circadian Clocks. **Cell,** 96, 271–290, 1999.

EHRET, M.; PEVET, P.; MAITRE, M. Tryptophan Hydroxylase Synthesis Is Induced by 3',5'-Cyclic Adenosine Monophosphate During Circadian Rhythm in the Rat Pineal Gland. **J. Neurochem,** 57(5), 1516-21,1991.

EMERY, P.; REPPERT, S.M. A rhythmic Rory. **Neuron**, 43(4), 443-6, 2004.

FERNANDES, P.A.C.M.; BOTHOREL, B.,CLESSE, D.,MONTEIRO, A.W.A.,CALGARI, C.; RAISON, S.; et al. Local Corticosterone Infusion Enhances Nocturnal Pineal Melatonin ProductionIn Vivo **J. Neuroendocrinology,** 21,90–97, 2009.

FERREIRA, Z.S.; FERNANDES, P.A.C.M.; DUMA, D.; ASSREUY, J.; AVELLAR, M.C.W.; MARKUS, R.P. Corticosterone modulates noradrenaline-induced melatonin synthesis through inhibition of nuclear factor kappa B. **J Pineal Res,** 38,182–188, 2005.

FRESE, T.; BACH, A.G.; MUHLBAUER, E.; PONICKE, H.J.; WELP, A.; PESCHKE, E. Pineal melatonin synthesis is decreased in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. **Life Sci,** 85(13-14), 526-33, 2009.

FUKUHARA, C.; LIU, C.; IVANOVA, T.N.; CHAN, G.C.K.; STORM, D.R.; LUVONE, P.M.; TOSINI, G. Gating of the cAMP Signaling Cascade and Melatonin Synthesis by the Circadian Clock in Mammalian Retina. **J Neurosci,** 4988-03, 2004.

FUKUOKA, Y.; BURIOKA, N.; TAKATA, M.; OHDO, S.; MIYATA, M.; ENDO, M.; SHIMIZU, E. Glucocorticoid administration increases hPer1 mRNA levels in human peripheral blood mononuclear cells in vitro or in vivo**. J Biol Rhythms,** 20(6), 550-553, 2005.

GANGULY, S.; COON, S.L.; KLEIN, D.C. Control of melatonin synthesis in the mammalian pineal gland: the critical role of serotonin acetylation. **Cell Tissue Res,**309(1), 127-37, 2002.

GANGULY, S.; GASTEL, J.A.; WELLER, J.L.; SCHWARTZ, C.; JAFFE, H.; NAMBOODIRI, M.A.A. Role of a pineal cAMP-operated arylalkylamine N-acetyltransferasey14-3-3-binding switch in melatonin synthesis. **PNAS**, 98(14), 8083– 8088, 2001.

GATHERCOLE, L.L.; BUJALSKA, I. J.; STEWART, P.M.; TOMLINSON, J.W. Glucocorticoid modulation of insulin signaling in human subcutaneous adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab,** 92(11), 4332-9, 2007.

GATHERCOLE, L.L.; MORGAN, S.A.; BUJALSKA, I. J.; HAUTON, D.; STEWART, P.M.; TOMLINSON, J.W. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. **Plos One,** 6(10), E26223, 2011.

GEKAKIS, N.; STAKNIS, D.; NGUYEN, H.B.; DAVIS, F.C.; WILSBACHER, L.D.; KING, D.P. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. **Science,** 280,1564–1569, 1998.

GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A.Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 50(2), 208-15, 2005.

GHOLAP, S.; KAR, A.Gymnemic acids from Gymnema sylvestre. Potentially regulates dexamethasone-induced hyperglycemia in mice. **Pharm Biol,** 43, 192–5, 2005.

GRACIA, R.A.; AFECHE, S.C.; SCIALFA, J.H.; do AMARAL, F.G.; dos SANTOS, S.H.; LIMA, F.B.; et al. Insulin modulates norepinephrine-mediated melatonin synthesis in cultured rat pineal gland. **Life Sci,** 82(1-2), 108-14, 2008.

GRAY, H.E.; LUTTGE, W.G.A putative glucocorticoid receptor in the rat pineal organ. **IRCS Med. Sci. Biochem**, 11, 437-438, 1983.

GRIVAS, T.B.; SAVVIDOU, O.Melatonin the "light of night" in human biology and adolescent idiopathic**. Scoliosis,** 2:6, 2007.

GROSS, K.L.; CIDLOWSKI, J.A.Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. **Trends Endocrinol Metab,** 19,331–339,2008.

GUYTON, A.; HALL, J. Tratado de fisiologia médica; tradução de Barbara de Alencar Martins; [et al.].- Rio de Janeiro: **Elsevier,** 2011.

HA, E.; YIM, S.V.; CHUNG, J.H.; YOON, K.S.; KANG, I.; CHO, Y.H.; et al.Melatonin stimulates glucose transport via insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in C2C12 murine skeletal muscle cells. **J Pineal Res,** 41(1), 67–72, 2006.

HAJAK, G.; RODENBECK, A.; EHRENTHA, H.D.; LEONARD, S.; WEDEKIND, D.; SENGOS, G. No evidence for a physiological coupling between melatonin and glucocorticoids. **Psychopharmacology**, 133, 313–322, 1997.

HAN, F.; OZAWA, H.; MATSUDA, K.; NISHI, M.; KAWATA, M.Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. **Neuroscience Research,** 51(4), 371–381,2005.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin – Multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine,** 27, 119-130, 2005.

HASEGAWA, Y.; SAWADA, S.; OKA, Y.; KATAGIRI, H. Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. Am J Physiol Endocrinol Metab, Doi 10 1152/2012 00388, 2012.

HASTINGS, M.H.; REDDY, A.B.; MAYWOOD, E.S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and dis-ease.**Nat. Rev. Neurosci**, 4, 649–61, 2003.
HAUS, E.Chronobiology in the endocrine system. **Adv Drug Deliv Rev**, 59(9-10), 985-1014, 2007.

HIDA, A.; KOIKE, N.; HIROSE, M.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; TEI, H.The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1 transcription. **Genomics,** 65:224–233, 2000.

HO, A.K. Modulation of Aanat gene transcription in the rat pineal gland. **J Neurochemistry,** 112(2), 321–331, 2010.

HONMA, S.; IKEDA, M.; ABE, H.; TANAHASHI, Y.; NAMIHIRA, M.; HONMA, K.; NOMURA, M. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. **Biochem. Biophy Res,** 250, 83–87, 1998.

HORI, W.; AOYAMA, H.; MORI, N. Melatonin protects rats from injurious effects of a glucocorticoid dexamethasone. **JPN J Exp Med,** 54(6), 255-61, 1984.

HUANG, Z.; DENG, J.; BORJIGIN, J. A novel H28Y mutation in LEC rats leads to decreased NAT protein stability in vivo and in vitro. **J Pineal Res,** 39, 84–90, 2005.

HUANG, Z.; LIU, T.; CHATTORAJ, A.; AHMED, S.;,WANG, M.M.; DENG, J. Posttranslational regulation of TPH1 is responsible for the nightly surge of 5-HT output in the rat pineal gland. **J Pineal Res**, 45(4), 506–514, 2008.

HUMPHRIES, A.; WELLS, T.; BALER, R.; KLEIN, D.; CARTER, D.A. Rodent Aanat: Intronic E-box sequences control tissue specificity but not rhythmic expression in the pineal gland. **Mol Cell Endocrinol,**270(1), 43–49, 2007.

JAHNG, J.W.; KIM, N.Y.; RYU, V.; YOO, S.B.; KIM, B.T.; KANG, D.W.; et al. Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats. **European Journal of Pharmacology,** 581, 64–70, 2008.

KALSBEEK, A.; VAN DER SPEK, R.; LEI, J.; ENDERT, E.; BUIJS, R.M.; FLIERS, E. Circadian rhythms in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Mol Cell Endocrinol,** 349(1),20-29, 2012.

KAPPERS, J.A. The development topografhical relation and inneervation of epiphysis cerebri in the albino rat. Zeit. **Zellforsch,** 52,163-215,1960.
KARAM, J.H. Hypoglycemic disorders. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. **Basic & clinical endocrinology,** 5th edition. New York:Mc Graw-Hill;p.701, 2001.

KARLSSON, S.; OSTLUND, B.; MYRSÉN-AXCRONA, U.; SUNDLER, F.; AHRÉN B. Beta cell adaptation to dexamethasone-induced insulin resistance in rats involves increased glucose responsiveness but not glucose effectiveness. **Pancreas,** 22, 148–156,2001.

KAROLCZAK, M.; BURBACH, G.J.; STIES, G.; KORF, H.W.; STEHLE, J.H. Clock gene mRNA and protein rhythms in the pineal gland of mice. **Eur J Neurosci,** 19, 3382-3388, 2004.

KAROLCZAK, M.; KORF H.W.; STEHLE, J.H. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. **Endocrine**, 27,89–100, 2005.

KAUTZKY-WILLER, A.; THOMASETH, K.; CLODI, M.; LUDVIK, B.; WALDHAUSL, W.; PRAGER, R.; et al. Beta-cell activity and hepatic insulin extraction following dexamethasone administration in healthy subjects.**Metabolism,** 45(4), 486-91, 1996.

KENNAWAY, D.J.; WRIGHT, H.Melatonin and Circadian Rhythms. **Current Topics in Medicinal Chemistry,** 2(2), 199-209.

KINO, T.;CHROUSOS, G.P. Glucocorticoid effect on gene expression. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM, eds. Handbook on stress and the brain, part 1. Amsterdam: **Elsevier BV,** 295–312, 2004.

KINO, T.;CHROUSOS, G.P. **Glucocorticoid effect on gene expression**. In: Steckler T, Kalin NH, Reul JMHM, eds. Handbook on stress and the brain, part 1. Amsterdam: Elsevier BV; 295–312, 2004.

KLEIN, D.; COON, S.; ROSEBOOM, P.; WELLER, J.; BERNARD, M.; GASTEL, J.; ZATZ, M.; et al. The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. **Recent Prog Horm Res,** 52, 307–357, 1997.

KLEIN, D.C. Arylalkylamine N-Acetyltransferase:"the Timezyme".**J biological chemistry,** 282(7), 4233–4237, 2007.

KLEIN, D.C. Evolution of the vertebrate pineal gland: the AANAT hypothesis. **Chronobiology International,** 23(1&2), 5–20, 2006.

KLEIN, D.C.; GANGULY, S.; COON, S.L.; SHI, Q.; GAILDRAT, P.; MORIN, F.; WELLER, J.L.; OBSIL, T.; HICKMAN, A.; DYDA, F. 14-3-3 proteins in pineal photoneuroendocrine transduction: how many roles?. **J Neuroendocrinol,**15, 370–377, 2003.

KLEIN, D.C.; WELLER, J.L. Indole Metabolism in the Pineal Gland: A Circadian Rhythm in N-Acetyltransferase. **Science,**169, 1093-1095, 1970.

KLEPAC, N.; RUDES, Z.; KLEPAC, R. Effects of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. **Biomed Pharmacother,** 60(1):32-5, 2005.

KONAKCHIEVA,R.; MITEV, Y.; ALMEIDA, O.F.X.; PATCHEV, V.K. Chronic Melatonin Treatment Counteracts Glucocorticoid-Induced Dysregulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in the Rat. **Neuroendocrinology,** 67,171-180, 1998.

KONOPKA, R.J.; BENZER, S.Clock mutants of Drosophila melanogaster. **Proc Natl Acad Sci USA,** 68, 2112-16, 1971.

KORF, H.W.; VON GALL,C. Mice, melatonin and the circadian system. **Mol Cell Endocrinol,** 252,57–68, 2006.

KOYANAGI, S.; OKAZAWA, S.; KURAMOTO, Y.; USHIJIMA, K.; SHIMENO, H.; SOEDA, S.; et al. Chronic Treatment with Prednisolone Represses the Circadian Oscillation of Clock Gene Expression in Mouse Peripheral Tissues. **Mol Endocrinol,** 20, 573-583, 2006.

KUHN, D.M,.; ARTHUR, R.; STATES, J.C.Phosphorylation and activation of brain tryptophan hydroxylase: identification of serine-58 as a substrate site for protein kinase A. J **Neurochem,** 68, 2220–2223, 1997.

KWON, I.; CHOE, H.K.; SON, G.H.; KIM, K. Mammalian Molecular Clocks. Experimental **Neurobiology**, 20, 18-28, 2011.

LA FLEUR, S.E.; KALSBEEK, A.; WORTEL, J.; VAN DER VLIET, J.; BUIJS, R.M. Role for the pineal and melatonin in glucose homeostase: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. **J Neuroendocrinol,** 13, 1025-32,2001.

LAMIA, K.A.; PAPP, S.J.; YU, R.T.; BARISH, G.D.; UHLENHAUT, N.H.; JONKER, J.W.; et al.Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. **Nature,** 480, 556-556, 2011.

LANE, N.E.;LUKERT, B.The science and therapy of glucocorticoid-induced bone loss. **Endocrinol Metab Clin North Am,** 27(2),465-83, 1998.

LERNER, A.B.; CASE, J.D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T,H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal factor that lightens melanocytes. **J Am Chem Soc,** 89, 2857–2858, 1958.

LIU, T.; BORJIGIN, J.Relationship between nocturnal serotonin surge and melatonin onset in rodent pineal gland. **J Circadian Rhythms,** 4:12, 2006.

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

LÓPEZ-MUÑOZ, F.; BOYA, J. El papel de la glándula pineal en la doctrina psicofisiológica cartesiana. **Acta Physiol Pharmacol Ther Latino am,** 42,205-16, 1992.

LÓPEZ-MUÑOZ,F.; MARÍN,F.; ÁLAMO, C. El devenir histórico de la glándula pineal: I. De válvula espiritual a sede del alma. **Rev Neurol,** 50: 50-7, 2010.

LOWREY, P.L.; TAKAHASHI, J.S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. **Annu Rev Genomics Hum Genet,** 5, 407-441, 2004.

MACCHI, M.M.;BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Front Neuroendocrinol,** 25(3-4), 177-95, 2004.

MARÇAL, A.C.; LEONELLI, M.; FIAMONCINI, J.; DESCHAMPS, F.C.; RODRIGUES, M.A.M.; CURI, R.; et al. Diet-induced obesity impairs AKT signaling in the retina and causes retinal degeneration. **Cell Biochemistry and Function,** 2012 DOI: 10.1002/cbf.2861.

MEDIAVILLA, M.D.; SANCHEZ-BARCELO, E.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.; REITER, R.J. Basic mechanisms involved in the anti-cancer effects of melatonin. **Curr Med Chem,**17(36), 4462-81, 2010.

MØLLER, M.; BAERES, F.M.M.The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell Tissue Res,** 309, 139–150, 2002.

MONTILLA, P.L.; VARGAS, J.F.; TÚNEZ, I.F.; MUÑOZ de AGUEDA, M.C.; VALDELVIRA, M.E.; CABRERA, E.S. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. **J Pineal Res,** 25(2):94-100, 1998.

MOORE, R.Y. Circadian rhythms: basic neurobiology and clinical applications. **Annu Rev Med,** 48, 253-266, 1997.

MOORE, R.Y.; LENN, N.J. A retinohy-pothalamic projection in the rat. **J Comp Neurol**, 146, 1–14, 1972.

MORGAN, L.; ARENDT, J.; OWENS, D.; FOLKARD, S.; HAMPTON, S.; DEACON, S.; et al.Effects of the endogenous clock and sleep time on melatonin, insulin, glucose and lipid metabolism. **J. of Endocrinology**, 157, 443–451, 1998.

MÜHLBAUER, E.; GROSS, E.; LABUCAY, K.; WOLGAST, S.; PESCHKE, E. Loss of melatonin signaling and impact on circadian rhythms in mouse organs regulating bood gluose. **Eur J Pharmacol,** 606(1-3), 61-71, 2009.

NADER, N.; CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Circadian rhythm transcription factor CLOCK regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by acetylating its hinge region lysine cluster: potential physiological implications. **FASEB,** 23(5), 1572–1583, 2009.

NADER, N.; CHROUSOS, G.P.; KINO, T. Interactions of the Circadian CLOCK System and the HPA Axis. **Trens Endocrinol Metab,** 21(5), 277-286, 2010.

NAMIHIRA, M.; HONMA, S.; ABE, H.; TANAHASHI, Y.; IKEDA, M.; HONMA, K. Daily variation and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the pineal body and different areas of brain in rats. **Neurosci Lett**, 267, 69-72, 1999.

NIKI, T.; HAMADA, T.; OHTOMI, M.; SAKAMOTO, K.; SUZUKI, S.; KAKO, K.; et al. The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina. Biochem. **Biophys Res Commun,** 248,115–120, 1998.

NISHIDA, S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. **Endorine,** 27(2), 131-6, 2005.

OTSUKA, M.; KATO, K.; MURAI, I.; ASAI, S.; IWASAKI, A.; ARAKAWA, Y. Roles of nocturnal melatonin and the pineal gland in modulation of water-immersion restraint stress-induced gastric mucosal lesions in rats. **J Pineal Res,** 30(2):82-6, 2001.

OXENKRUG, G.F., MCINTYRE, I.M.; GERSHON, S. Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosteroids circadian rhythm in rats.**J Pineal Res**,1(2),181-5, 1984.

PANG, S.F.; TANG, F.; TANG, P.L. Alloxan-induced diabetes and the pineal gland: differential effects on the levels of pineal N-acetylserotonina pineal melatonin, and serum melatonin. **J Pineal Res,** 2, 79-85,1985.

PAREDES, S.D.; SÁNCHEZ, S.; PARVEZ, H.; RODRÍGUEZ, A.B.; BARRIGA, C. Altered circadian rhythms of corticosterone, melatonin, and phagocytic activity in response to stress in rats. **Neuroendocrinol Lett**, 28 (4),489-95, 2007.

PARFITT, A.; WELLER, J.L.; KLEIN, D.C.; SAKAI, K.K.; MARKS, B.H. Blockade by ouabain or elevated potassium ion concentration of the adrenergic and adenosine cyclic 3′,5′-monophosphate-induced stimulation of pineal serotonin N-acetyltransferase activity. Mol Pharmacol 11, 241–255, 1975.

PELICIARI-GARCIA, R.A.; MARÇAL, A.C.; SILVA, J.S.; CARMO-BUONFIGLIO, D.; AMARAL, F.G.; AFECHE, S.C.; et al. Insulin temporal sensitivity and its signaling pathway in the rat pineal gland. **Life Sci,** 87(5-6),169-74, 2010.

PENICAUD, L,.; LE MAGNEN, J. Aspects of the neuroendocrine bases of the diurnal metabolic cycle in rats. **Neurosci Biobehav Rev,** 4, 39–42, 1980.

PESCHKE, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes.**J Pineal Res,** 44,26–40, 2008.

PESCHKE, E.; FRESE, T.; CHANKIEWITZ, E.; PESCHKE, D.; PREISS, U.; SCHNEYER U.; et al. 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,**40, 135–143, 2006.

PESCHKE, E.; PESCHKE, D.Evidence for a circadian rhythm of insulin release from perifused rat pancreatic islets.**Diabetologia,** 41,1085–1092, 1998.

PEZÜK, P.; MOHAWK, J.A.; WANG, L.A.; MENAKER, M. Glucocorticoids as Entraining Signals for Peripheral Circadian Oscillators.**Endocrinology,**153, 4775-4783, 2012.

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.**Pineal Res,** 33(3),172-7, 2002.

POON, A.M.; CHOY, E.H.; PANG, S.F. Modulation of blood glucose by melatonin: a direct action on melatonin receptors in mouse hepatocytes. **Biol Signals Recept,**10(6), 367–79, 2001.

QI, W.; REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; KIM, S.J.; GARCIA, J.J. Inhibitory effects of melatonin on ferric nitrilotriacetate-induced lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the rat kidney. **Toxicology,** 29,139(1-2), 81-91, 1999.

RAFACHO, A.; ABRANTES, J.L.; RIBEIRO, D.L.; PAULA, F.M.; PINTO, M.E.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. Morphofunctional alterations in endocrine pancreas of short- and long-term dexamethasone-treated rats**.Horm Metab Res,** 43(4), 275-81, 2011.

RAFACHO, A.; CESTARI, T.M.; TABOGA, S.R.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. High doses of dexamethasone induce increased beta-cell proliferation in pancreatic rat islets. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** 296(4), E681-9, 2009.

RAFACHO, A.; GIOZZET, V.A.G.; BOSCHERO, A.C.; BOSQUEIRO, J.R. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance.**Pancreas,** 36, 284-293, 2008.

RAFACHO, A.; MARROQUÍ, L.; TABOGA, S.R.; ABRANTES, J.L.; SILVEIRA, L.R.; BOSCHERO, A.C.; et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology,** 151, 85-95, 2010.

REDDY, A.B.; MAYWOOD, E.S.; KARP, N.A.; KING, V.M.; INOUE, Y.; GONALEZ, F.J.; et al. Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome.**Hepatology,** 45(6), 1478-88, 2007.

REDMAN, J.; ARMSTRONG, S.; NG, K.T. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. **Science,** 219, 1089–1091,1983.
REITER, R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness. **Mol Cell Endocrinol,** 79, 153–158, 1991.

REITER, R.J. The mammalian pineal gland: Structure and function. **American J Anatomy,** 162, 287-313, 1981.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; LEON, J.; CZAR-NOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mecha-nisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Bio-chim,** 50, 1129-1146, 2003.

REITER,R.J.The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals.**Endocr Rev,** 1, 109–131, 1980.

REPPERT, S.; GODSON, C.; MAHLET, 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 Mellb melatonin receptor. **Proc. Nati. Acad. Sci. USA,** 92, 8734-8738, 1995.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.Coordination of circadian timing in mammals. **Nature,** 418(6901), 935-941, 2002.

REPPERT, S.M.; WEAVER, D.R.Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. **Ann. Rev. Physiol,** 63, 647–676, 2001.

RIBELAYGA, C.; GARIDOU, M.L.; MALAN, A.; GAUER, F.; CALGARI, C.; PÉVET, P.; SIMONNEAUX, V. Photope-riodic control of the rat pineal arylalkylamine-N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase gene expression and its consequence on melatonin synthesis.**J Biol Rhythms,** 14,105–115, 1999.

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,**140(3),1999.

RICHTER, H.G.; TORRES-FARFAN, C.; GARCIA-SESNICH, J.; ABARZUA-CATALAN, L.; HENRIQUEZ, M.G.; ALVAREZ-FELMER, M.; et al. Rhythmic Expression of Functional MT1 Melatonin Receptors in the Rat Adrenal Gland**. Endocrinology,**149 (3), 995-1003, 2008.

RODRIGUEZ, I.R.; BEGAY, V.; FALCON, J.; CAHILL, G.M.; CASSONE, V.M.; BALER, R.The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotoninN-acetyltransferase in the pineal gland. **Recent Prog Horm Res,** 52, 307–357, 1997.

ROSEBOOM, P.H.; KLEIN, D.C. Norepinephrine Stimulation of Pineal Cyclic AMP Response Element-Binding Protein Phosphorylation: Primary Role of a 3-Adrenergic Receptor/Cyclic AMP Mechanism. **Mol Pharmacol,** 47,439-449, 1995.

RUDIC, R.D.; MCNAMARA, P.; CURTIS, A.M.; BOSTON, R.C.; PANDA, S.; HOGENESCH, J.B.; et al. BMAL1 and CLOCK, Two Essential Components of the Circadian Clock, Are Involved in Glucose Homeostasis. **PLoS Bio,** 2(11):e377, 2004.

RUZZIN, J.; WAGMAN, A.S.; JENSEN, J. Glucocorticoid-induced insulin resistance in skeletal muscles: defects in insulin signalling and the effects of a selective glycogen synthase kinase-3 inhibitor. **Diabetologia,** 48:2119–30, 2005.

SAAD, M.J.; FOLLI, F.; KAHN, J.A.; KAHN, C.R.Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. **J Clinical Invest,** 92, 2065-2072, 1993.

SAKODA, H.; OGIHARA, T.; ANAI, M.; FUNAKI, M.; INUKAI, K.; et al. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. **Diabetes,** 49,1700–1708, 2000.

SARRIEAU, A.; DUSSAILLANT, M.; MOGUILEWSKY, M.; COUTABLE, D.; PHILIBERT, D.; ROSTÈNE, W. Autoradiographic localization of glucocorticosteroid binding sites in rat brain after in vivo injection of [3H]RU 28362.**Neuroscience Letters,** 92,14-20, 1988.

SARTORI, C.; DESSEN, P.; MATHIEU, C.; MONNEY, A.; BLOCH, J.; NICOD, P.; SCHERRER, U.; DUPLAIN, H. Melatonin improves glucose homeostasis and endothelial vascular function in high-fat diet-fed insulin-resistant mice.**Endocrinology,** 150(12), 5311-7, 2009.

SATO, T.K.; PANDA, S.; MIRAGLIA, L.J.; REYES, T.M.; RUDIC, R.D.; MCNAMARA, P.; et al. Functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock.**Neuro,** 43,527-537, 2004.

SCHAAD, N.J.; VANECEK, J.; KOSAR, E.; AUBRY, J.M.; SCHULZ, P.E. Adrenergic control of rat pineal NO synthase. **J Neurochem,** 65(2):935-938, 1995.

SCHACKE, H.; DOCKE, W.D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, 96:23–43, 2002.

SCHEER, F.A.; HILTON, M.F.; MANTZOROS, C.S.; SHEA, S.A. Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. **Proc Natl Acad Sci USA,** 106(11), 4453–8, 2009.

SCHIBLER, U.; SASSONE-CORSI, P. A web of circadian pacemakers.**Cell,** 111(7), 919-22, 2002.

SEGAL, L.A.; MILET, A.; TRONCHE, F.; AMIR, S.Brain glucocorticoids receptors are necessary for the rhythmic expression of the clock protein, Period2, in the central extended amygdala in mice. **Neuroscience Letters,** 457(1):58-60, 2009.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance, Best Practice & Research in Clinical.**Endocrinology & Metabolism,** ed.4, 20, 665–679, 2006.

SHIGEYOSHI, Y.; TAGUCHI, K.; YAMAMOTO, S. Light-induced resetting of a mammalian circadian clocks is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. **Cell,** 91, 1043-1053, 1997.

SIMONNEAUX, V.; MARKUS, P.R. Local Corticosterone Infusion Enhances Nocturnal Pineal Melatonin ProductionIn Vivo. **J. Neuroendocrinology,** 21, 90–97, 2009.

SIMONNEAUX, V.; POIREL, V.J.; GARIDOU, M.; NGUYEN, D.; DIAZ-RODRIGUEZ, E.; PEVET, P. Daily rhythm and regulation of clock gene expression in the rat pineal gland. **Brain Res. Mol. Brain Res,** 120,164–172, 2004.

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 Ver,** 55,325–395, 2003.

SO, A.Y.L.; BERNAL, T.U.; PILLSBURY, M.L.; YAMAMOTO, K.R.; FELDMAN, B.J. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis.**Proc Natl Acad Sci U S A,** 106(41), 17582–17587, 2009.

SON, G.H.; CHUNG, S.; KIM, K. The adrenal peripheral clock: Glucocorticoid and the circadian timing system. **Front Neuroendocrinol,** 32,451–465, 2011.

STEBELOYÁ, K.; HERICHOVÁ, I.; ZEMAN, M. Diabetes induces changes in melatonin concentrations in peripheral tissues of rat. **Neuro Endocrinol Lett,** 28(2), 159-65, 2007.

STEHLE, J.H.; VON GALL, C.; KORF, H.W. Melatonin: a clock-output, a clock-input. **J Neuroendocrinol,**15(4), 383-9, 2003.

SUGDEN, D.; KLEIN, D.C. Activators of protein kinase C act at a postreceptor site to amplify cyclic AMP production in rat pinealocytes. **J Neurochem,** 50,149–155,1988.

SUGDEN, D.Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. **J Neurochem,** 86,1308–1311, 2003.

SWANSON, L.W.; COWAN, W.M. The efferent connections of the suprachiasmatic nucleus of the hypothalamus. **J Comp Neurol,** 160,1–12, 1975.

TAIT, A.S.; BUTTS, C.L.; STERNBERG, E.M. The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. **Journal of Leukocyte Biology,** 84, 924-931, 2008.

TAKAHASKI, K.; YAMADA, T.; TSUKITA, S.; KANEKO, K.; SHIRAI, Y.; MUNAKATA Y.; et al. A new mammalian period gene predominantly expressed in the suprachiasmatic nucleus. **Genes to Cells,** 3,167-176, 1998.

TAKUMI, T., TAGUCHI, K., MIYAKE, S., SAKAKIDA, Y., TAKASHIMA, N. MATSUBARA, C., et al.A light-independent oscillatory genemPer3 in mouse SCN and OVLT. **EMBO J,** 17, 4753–4759, 1998.

TEI, H.; OKAMURA, H.; SHIGEYOSHI, Y.; FUKUHARA, C.; OZAWA, R.; HIROSE, M.; SAKAKI, Y. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the Drosophila period gene. **Nature**, 389, 512-516, 1997.

TORRA, I.P.; TSIBULSKY, V.;DELAUNAY, F.; SALADIN, R.; LAUDET, V.; FRUCHART, J.C.; KOSYKH, V.;STAELS, B.Circadian and Glucocorticoid Regulation of Rev-erbα Expression in Liver.**Endocrinology,** 141, 3799-3806, 2000.

TORRES-FARFAN, C.; SERÓN-FERRÉ, M.; DINET, V.; KORF, H.W. Immuno-cytochemical demonstration of day/night changes of clock gene protein levels in the murine adrenal gland: differences between melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice. **Journal Pineal Reserarch,** 40, 64–70, 2006.

TOSINI, G.; FUKUHARA, C.The mammalian retina as a clock.**Cell Tissue Res,** 309, 119-126, 2002.

TROIANI, M.E.; REITER, R.J.; VAUGHAN, M.K.; GONZALEZ-BRITO, A.; HERBERT, D.C.The depression in rat pineal melatonin production after saline injection at night may be elicited by corticosterone.**Brain Res,** 450(1-2), 18-24, 1998.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol,** 3:research0034-research0034.11, 2002.

VAUGHAN, M.K.; VAUGHAN, G.M.; REITER, R.J.; BENSON, B. Effect of Melatonin and Other Pineal Indoles on Adrenal Enlargement Produced in Male and Female Mice by Pinealectomy,Unilateral Adrenalectomy, Castration, and Cold.**Neuroendocrinology,** 10,139–154, 1972.

VITATERNA, M.H.; KING, D.P.; CHANG, A.M.; KO-RNHAUSER, J.M.; LOWREY, P.L.; et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior.**Science,** 264,719–25, 1994.

VOLLRATH, L. The pineal organ, in: OKSCHE, A.; VOLLRATH, L. Handbuch der milkroskopischen anatomie des mesnschen, 6. Berlin: Springer, 1981.

VON GALL, C.; SCHNEIDER-HÜTHER, I.; PFEFFER, M.; DEHGHANI, F.;, KORF, H.W.; STEHLE, J.H. Clock Gene Protein mPER1 is Rhythmically Synthesized and Under cAMP Control in the Mouse Pineal Organ. **Neuroendocrinol J,** 13, 313 – 316, 2001.

WEISSBACH, H.; REDFIELD, B.C.; AXELROD, J. Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acety-lserotonin.**Biochim Biophys Acta,** 43, 352–53, 1960.

WELSH, D.K.; TAKAHASHI, J.S.; KAY, S.A. Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. **Annu Rev Physiol,** 72,551–577, 2010.

WONGCHITRAT,P.; FELDER-SCHMITTBUHL, M.P.; PHANSUWAN-PUJITO, P.; SIMONNEAUX, P.P. Endogenous rhythmicity of Bmal1and Rev-erbain the hamster pineal gland is not driven by norepinephrine. **Eur J Neurosci,** 29, 2009–2016, 2009.

WU, X.; YU, G.; PARKS, H.; HEBERT, T.; GOH, B.C.; DIETRICH, M.A.; et al. Circadian Mechanisms in Murine and Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Following Dexamethasone Exposure. **Bone,** 42(5), 861-870, 2008.

WURTMAN, R.J.; AXELROD, J. The pineal gland. **Sci Am,** 213: 50-60, 1965.

YAMAMOTO, T.; NAKAHATA, Y.; TANAKA, M.; YOSHIDA, M.; SOMA, H.; SHINOHARA, K.; et al. Acute Physical Stress Elevates Mouse Period1 mRNA Expression in Mouse Peripheral Tissues via a Glucocorticoid-responsive Element. **J Biol Chem,** 280, 42036-42043, 2005.

YAN, J.; WANG, H.; LIU, Y.; SHAO, C. Analysis of Gene Regulatory Networks in the Mammalian Circadian Rhythm. **PLoS One,** 4(10), e1000193,2008.

YANG, S.; LIU, A.; WEIDENHAMMER, A.; COOKSEY, R.C.; MCCLAIN, D.; KIM M.K.; AGUILERA, G.; ABEL, E.D.; CHUNG, J.H.The Role of mPer2 Clock Gene in Glucocorticoid and Feeding Rhythms. **Energy balance – Obesity,** 150(5), 2153, 2009.

YOCCA, F.D.; FRIEDMAN, EEffect of immobilization stress on rat pineal beta-adrenergic receptor-mediated function.**J Neurochem,** 42(5), 1427-32,1984.

YOUNG, M.E.; BRAY, M.S. Potential Role for Peripheral Circadian Clock Dyssynchrony in the Pathogenesis of Cardiovascular Dysfunction.**Sleep Med,** 8(6), 656–667, 2007.

YUWILER, A.Effects of steroids on serotonin-N-acetyltransferase activity of pineals in organ culture.**J Neurochem,** 52(1),46-53, 1989.

ZAWILSKA, J.B.; SADOWSKA, M. Prolonged treatment with glucocorticoid dexamethasone suppresses melatonin production by the chick pineal gland and retina**. Pol J Pharmacol,** 54:61–66, 2002.

ZAWILSKA, J.B.; SKENE, D.J.; ARENDT, J.Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms.**Pharmacological Reports**, 61, 383-410, 2009.

ZHAO, Z.Y.; TOUITOU, Y. Kinetic changes of melatonin release in rat pineal perfusions at different circadian stages.Effects of corticosteroids. **Acta Endocrinol,** 129,81–88, 1993.

ZYLKA, M.J.; SHEARMAN, L.P.; WEAVER, D.R.; REPPERT, S.M. Three period homologs in mammals: Differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain**. Neuron,** 20(6),1103-1110, 1998.

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado "Regulaç da síntese de melatonina pela glândula pineal: características funcionais mecanismos moleculares em condições de resistência a ação de insulina", s coordenação do Prof. Anderson Carlos Marçal (protocolo CEPA 54/2009), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universida Federal de Sergipe, em reunião realizada dia 22/04/2010.

São Cristóvão, 23 de abril de 2010

Profª. Drª. Flavia Teixeira Silva
Presidente do CEPA/UFS

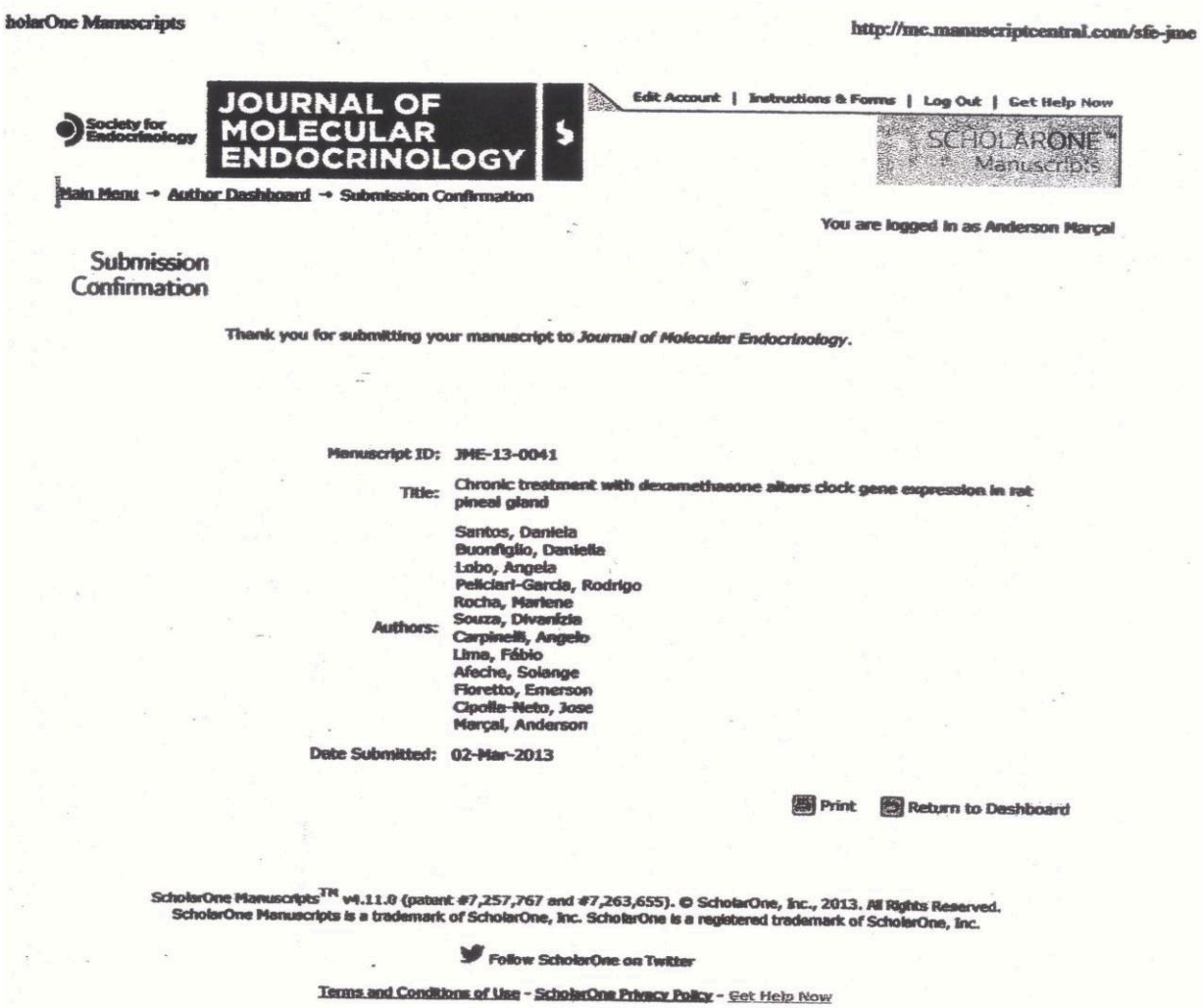
Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"
Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE
49100-000
Fones: 3212 6661/6606

APÊNDICE B

Quadro 1: Sequências dos primers utilizados

Primer	Número de Acesso GeneBank	Fragmento	Primer	Sequências
Tph1	NM_001100634	98	Forward Reverse	5'-CTCTTGGAGCTTCAGAGGAGAC-3' 5'-GACTCTCAGCTGCCCATCTTG-3'
Aanat	NM_012818	110	Forward Reverse	5'-AAAGTACACTCAGGCACCAATGT-3' 5'-GGGAACATAGCTGCTTTATTAGTGTCAG-3'
Hiomt	NM_144759.2	112	Forward Reverse	5'- TGCCCGCACCCACTTCCTGTC-3' 5'- GACCCGGGCAAGAATGAAGAG-3'
Bmal1	NM_024362.2	77	Forward Reverse	5' – CCGATGACGAACTGAAACACC –3' 5' – TCTTCCCTCGGTCACATCCT –3'
Rev-*erbα*	NM_145775.1	81	Forward Reverse	5' – AGGTGACCCTGCTTAAGGCTG –3' 5' – ACTGTCTGGTCCTTCACGTTGA –3'
Per1	NM_001034125.1	71	Forward Reverse	5' – CTGCCTCAGGCCCTCGA –3' 5' – GTCCGAGTGGCCAGGATCTT –3'
Per2	NM_031678.1	75	Forward Reverse	5' – GCAGCCTTTCGATTATTCTCCC –3' 5' – GGACCAGCTAGTGTCCAGTGTG –3'
Cry1	NM_198750.2	74	Forward Reverse	5' – TTCGCCGGCTCTTCCAA –3' 5' – ATTGGCATCAAGGTCCTCAAGA –3'
Cry2	NM_133405.1	76	Forward Reverse	5' – TCAGCGTGAATGCAGGCA –3' 5' – AGGGCAGTAGCAGTGGAAGAAC –3'
InsR	NM_017071	90	Forward Reverse	5' –TCTGATTGTGCTATATGAAGTGAGCTATC–3' 5' – CCGCTCCAGGGCAAAAT –3'
Adcy1	NM_001107239.1	77	Forward Reverse	5' – TGCGGCTGGAAGATGAGAA –3' 5' – TCATCTCCATGGCGACATTC –3'
Glut1	NM_138827.1	111	Forward Reverse	5'-ACCCTGCATCTCATTGGTCT-3' 5'-GGCCACGATACTCAGATAGGAC-3'
Actb	NM_031144	97	Forward Reverse	5'-CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3' 5'-AAGACCTCTATGCCAACACAGTG-3'
Rpl37a	NM_001108801	93	Forward Reverse	5'-CGCTAAGTACACTTGCTCCTTCTG-3 5'-GCCACTGTTTTCATGCAGGAAC-3'
Actg1	NM_001127449	80	Forward Reverse	5'-TACCCTATTGAGCACGGCAT-3' 5'-CGCAGCTCGTTGTAGAAGGT-3'

ANEXO A



holarOne Manuscripts http://mc.manuscriptcentral.com/sfe-jme

Society for Endocrinology

JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY

Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now

SCHOLARONE Manuscripts

Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation

You are logged in as Anderson Marçal

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Journal of Molecular Endocrinology*.

Manuscript ID: JME-13-0041

Title: Chronic treatment with dexamethasone alters clock gene expression in rat pineal gland

Authors: Santos, Daniela
Buonfiglio, Daniella
Lobo, Angela
Peliciari-Garcia, Rodrigo
Rocha, Marlene
Souza, Divanizia
Carpinelli, Angelo
Lima, Fábio
Afeche, Solange
Fioretto, Emerson
Cipolla-Neto, Jose
Marçal, Anderson

Date Submitted: 02-Mar-2013

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.11.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

Terms and Conditions of Use - ScholarOne Privacy Policy - Get Help Now