

### RESUMO

A influência da glândula pineal sobre o metabolismo de carboidratos vem sendo investigada há décadas. Entretanto, resultados contraditórios não esclarecem, até o momento, o verdadeiro papel da melatonina sobre a homeostasia dos carboidratos. Através de estudos recentes, contribuimos de maneira inequívoca para a caracterização do papel da glândula pineal como moduladora do metabolismo de carboidratos. Além disso, à luz dos conhecimentos atuais, demonstramos quais passos do mecanismo de ação da insulina estão envolvidos nessa modulação. Nossos estudos revelaram que a pinealectomia promove um quadro de resistência à insulina, sem obesidade. A captação máxima de 2-deoxi-glicose, estimulada por insulina, em adipócitos isolados está diminuída, sem entretanto modificar a capacidade da insulina ligar-se ao seu receptor e estimular a fosforilação dos substratos intracelulares representados pela pp 185. Por outro lado, em vários tecidos sensíveis à insulina, observou-se uma diminuição no conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4, mas diminuição no mRNA do GLUT4 apenas em alguns desses tecidos, sugerindo uma regulação tecido-específica. Adicionalmente, foi demonstrado que a regulação da glândula pineal sobre o metabolismo de carboidratos é mediado pela melatonina: o hormônio aumentou a sensibilidade à insulina de adipócitos isolados e o tratamento de reposição com melatonina restaurou o conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo branco. Em síntese, os estudos aqui relatados evidenciam um importante papel da glândula pineal na modulação da homeostasia de carboidratos. Essa regulação é dependente da melatonina e pode ser resumida, até o presente momento, como um aumento da sensibilidade tecidual à insulina, que envolve alterações na expressão gênica do GLUT4. (Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 331-338)

**Unitermos:** Melatonina; Glândula pineal; Metabolismo de carboidratos; Homeostasia glicêmica; GLUT4

### ABSTRACT

For decades, the influence of the pineal gland on carbohydrate metabolism has been investigated. However, contradictory results have not yet elucidated the role played by melatonin in carbohydrate homeostasis. In our recent studies, we have contributed to characterize the role of the pineal gland as a modulator of carbohydrate metabolism. In addition, based on present-day knowledge, we have demonstrated the steps of insulin action mechanism involved in this modulation. Our studies reveal that pinealectomy causes a condition of obesity-free insulin resistance. The maximum uptake of 2-deoxy-glucose prompted by insulin in isolated adipocytes is diminished, without however changing the insulin capacity to bind to its receptor, and to stimulate the phosphorylation of intracellular substrates represented by pp 185. Conversely, in several insulin-sensitive tissues, our studies detected a decrease in the amount of glucose transporter protein GLUT4, and a decrease in GLUT4 mRNA in only some of these

*Patrícia Monteiro Seraphim  
Doris Hissako Sumida  
Fabiana Yumi Nishide  
Fábio Bessa Lima  
José Cipolla Neto  
Ubiratan Fabres Machado*

*Departamento de Fisiologia e  
Biofísica, Instituto de Ciências  
Biomédicas, Universidade de São  
Paulo (USP), São Paulo, SP.*

*Recebido em 13/09/1999  
Revisado em 18/02/2000  
Aceito em 10/04/2000*

tissues, suggesting a tissue-specific regulation. Additionally, it was demonstrated that the pineal gland regulation influences carbohydrate metabolism through melatonin, by our demonstration that the hormone increased insulin sensitivity of isolated adipocytes, and that melatonin replacement therapy restored the amount of GLUT4 in white adipose tissue. In summary, the studies reported here evidence an important role played by the pineal gland in the modulation of carbohydrate homeostasis. This regulation seems to be melatonin-dependent and can be described, so far, as an increase in tissue sensitivity to insulin, which involves changes in GLUT4 gene expression. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2000;44/4: 331-338**)

**Keywords:** Melatonin; Pineal gland; Carbohydrate metabolism; Glycemic homeostasis; GLUT4

**A**MELATONINA É UM HORMÔNIO da glândula pineal, secretado exclusivamente à noite. Portanto, a atividade secretória da glândula pineal apresenta um ritmo circadiano relacionado com o período escuro (noite), cuja duração, variando ao longo do ano de acordo com as estações, determina um padrão secretório com variações diárias e sazonais (1). Estas características de secreção determinam o papel fisiológico da glândula pineal: sinalizar para o meio interno, pela presença ou ausência de melatonina nos líquidos corporais, se é dia ou noite no meio exterior e sinalizar, pelo perfil diário do hormônio, qual a estação do ano. Desta forma, a pineal confere ritmos a uma série de funções neuroendócrinas que modula, determinando, por exemplo, o ciclo sono-vigília, a atividade reprodutora e a atividade metabólica de várias espécies (1).

Terminações simpáticas do gânglio cervical superior liberam norepinefrina de acordo com um ritmo circadiano, o qual está relacionado ao ciclo claro-escuro do meio ambiente, aumentando a secreção do neurotransmissor durante a fase escura. Na glândula pineal, a norepinefrina age em receptores  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  determinando a ativação da enzima chave aril-alkilamina *N*-acetiltransferase (ou serotonina acetiltransferase), o que determina a produção circadiana da melatonina (2). Assim, a concentração plasmática de melatonina varia de acordo com o período escuro do meio ambiente, produzindo as modulações diárias e sazonais de uma série de processos fisiológicos que estão relacionados à melatonina (3-5).

## GLÂNDULA PINEAL E REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

### Ações no metabolismo de carboidratos

É bastante conhecido o papel da melatonina na regulação do metabolismo energético de animais hibernantes,

nos quais o padrão de secreção anual de melatonina é responsável pela sincronização sazonal dos surtos de hibernação. O padrão de secreção de melatonina é responsável tanto pelo início da hibernação, quando a regulação térmica passa de homeotérmica para heterotérmica, assim como pelo fim do processo, quando retorna o padrão homeotérmico (6). Por outro lado, em mamíferos não hibernantes, um possível papel fisiológico da glândula pineal na regulação do metabolismo de carboidratos tem sido investigado há décadas, tanto em roedores (7) como em humanos (8); no entanto, esta relação não está clara até o momento.

Em ratos, foi demonstrado que a pinealectomia induz diminuição na glicogenogênese hepática e muscular, assim como aumento na concentração de piruvato plasmático. Adicionalmente, foi relatado que a infusão de extrato de pineal promove redução glicêmica, que envolve aumento na tolerância à glicose e na glicogenogênese hepática e muscular, em resposta a uma sobrecarga glicídica (7). O papel da glândula pineal sobre a regulação do metabolismo de carboidratos foi reforçado por estudos que demonstraram alterações na concentração plasmática da glicose, insulina e glucagon em ratos pinealectomizados (9). Além disso, foi demonstrado que a elevação glicêmica, decorrente do tratamento de ratos com aloxana, é maior em ratos pinealectomizados do que em ratos normais, sugerindo que a pinealectomia conduz a uma elevação glicêmica (10).

Também já foi demonstrado que vários parâmetros metabólicos, entre os quais os níveis plasmáticos de glicose, apresentam ritmo diurno que independe do comportamento alimentar, conforme foi relatado em ratos em jejum, sugerindo que fatores endógenos, adicionalmente aos fatores ambientais (alimentação e ciclo claro-escuro) modulam as flutuações rítmicas observadas no metabolismo dos carboidratos ao longo do dia (11). Adicionalmente, na vigência de livre curso alimentar, é evidente que tanto humanos (12,13) como ratos (14) apresentam flutuações diurnas na resposta ao teste de tolerância à glicose, assim como estão demonstradas variações circadianas na sensibilidade à insulina (15,16).

Uma questão importante, relacionada ao metabolismo de carboidratos, é a possibilidade de a glândula pineal influenciar quantitativa ou qualitativamente o comportamento alimentar, o que poderia levar a alterações na composição corporal, modificando a relação entre massa magra e massa gorda ou, até mesmo, conduzindo à obesidade (17).

Por outro lado, a glândula pineal interfere na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, um

importante modulador do metabolismo de carboidratos. Ratos pinealectomizados apresentam um aumento na corticosterona plasmática ao longo do dia, o que pode estar envolvido na alteração da sensibilidade tecidual à insulina e, conseqüentemente, no metabolismo de carboidratos (18).

### Ações na secreção de insulina

A secreção de insulina, estreitamente relacionada ao metabolismo de carboidratos, também apresenta um ritmo que varia de acordo com o período do dia (19), o que sugere que esta função possa estar relacionada à fisiologia da glândula pineal. Em humanos, a responsividade da célula  $\beta$  pancreática a uma determinada sobrecarga de glicose é maior pela manhã e declina no decorrer do dia até o início da noite (20). Em roedores o fenômeno parece ser similar, entretanto as flutuações são exatamente invertidas, com a responsividade aumentando no final do dia e diminuindo no início da manhã (14). Foi descrito que a pinealectomia, ou a incubação de ilhotas pancreáticas em meio contendo extrato de pineal, alteram a secreção de insulina por ilhotas pancreáticas (21); por outro lado, nenhum efeito foi observado no padrão de secreção de insulina por ilhotas pancreáticas incubadas em presença de concentrações fisiológicas de melatonina (22).

Embora existam relatos contraditórios sobre a ação da melatonina na secreção da insulina (21,22) e o papel da glândula pineal e/ou da melatonina na função da célula  $\beta$  pancreática ainda não esteja completamente esclarecido, alguns mecanismos putativos podem ser considerados como envolvidos em uma ação direta ou indireta sobre a secreção de insulina.

Sabe-se que a melatonina age em células alvo ligando-se a receptores específicos localizados na membrana plasmática da célula, estes receptores já foram demonstrados no pâncreas (23). Um destes receptores ( $Mel_{1a}$ ) é capaz de inibir a adenilatociclase e potencializar a atividade da fosfolipase C (PLC), conduzindo a uma amplificação da atividade da proteína-quinase C (PKC) (24). Como o sistema PLC/PKC está relacionado ao processo de secreção da insulina (25), é possível imaginar-se que a pinealectomia possa alterar a ativação do sistema PLC/PKC na célula  $\beta$  pancreática.

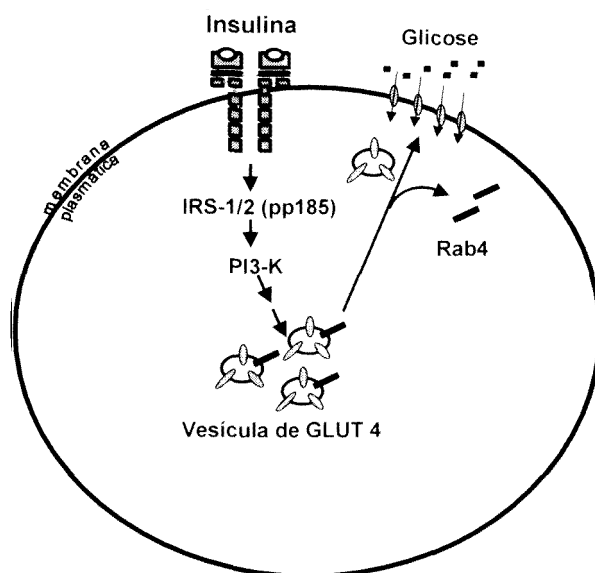
De maneira indireta, a pineal poderia alterar a secreção de insulina através da modulação que exerce tanto na atividade autonômica, como na responsividade tecidual aos neurotransmissores. Uma inibição na capacidade secretora da célula  $\beta$  pancreática, assim como na resposta tecidual à insulina, poderia ocorrer em animais pinealectomizados como conseqüência às alterações autonômicas instaladas (4,26).

### TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO

A última década trouxe grandes conhecimentos sobre o mecanismo de transdução do sinal insulínico, especialmente no que se refere à capacidade dos tecidos insulino-sensíveis captarem a glicose para posterior utilização. Os tecidos em que a captação da glicose é estimulada pela insulina são os músculos, esquelético e cardíaco, e os tecidos adiposos, branco e marrom, que são chamados de tecidos insulino-sensíveis. Nestes territórios a insulina estimula a captação da glicose para estoque de sua energia, seja na forma de glicogênio seja na forma de triacilglicerol, conforme as características de cada um, ou, ainda, para geração de calor, como ocorre na termogênese do tecido adiposo marrom.

A transdução do sinal insulínico está bem caracterizada, e a figura 1 resume as principais etapas envolvidas no processo de estimulação da captação de glicose pela insulina.

A insulina exerce seu efeito através da ligação a um receptor específico na membrana plasmática. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica, constituída por duas sub-unidades  $\alpha$ , cada uma com peso molecular de 135KDa, e duas sub-unidades  $\beta$ , cada uma com peso molecular de 95KDa, ligadas por pontes de dissulfeto (27). A sub-unidade  $\alpha$  é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A sub-unidade  $\beta$  é uma proteína transmembrânica e responsável pelo início da transdução do sinal insulínico. A sub-unidade  $\beta$  do receptor de insulina é uma proteína-quinase, estimulada pela insulina e capaz de se autofosforilar e de fosforilar outros substratos em aminoácidos tirosina (28). O receptor, uma vez fosforilado em decorrência de sua ativação pela insulina, passa a fosforilar um substrato intracelular, o IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), uma proteína de 185KDa com vários resíduos tirosil em sua cadeia polipeptídica, alguns deles localizados em sequência do tipo YMXM ou YXXM (29). Quando o IRS-1 está fosforilado, pode interagir com proteínas contendo a porção SH2. Entre essas proteínas está uma enzima, a fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3K). Demonstrou-se que a ativação da PI3K é essencial para o transporte de glicose pois o tratamento de células com o inibidor específico desta enzima, o *wortmannin*, bloqueia a captação de glicose (30). Um segundo substrato (IRS-2), já bem caracterizado, também possui peso molecular em torno de 185KDa e pode participar de maneira semelhante, mas não idêntica, ao IRS-1 na transdução do sinal insulínico. Dessa forma, a fosforilação de proteínas pp 185 representa a ativação indistinta dos substratos IRS-1/2 (31).



**Figura 1.** Esquema simplificado do mecanismo pelo qual a insulina estimula o transporte de glicose. A insulina, ligando-se ao seu receptor na membrana plasmática, desencadeia a autofosforilação do receptor, que ativará substratos intracelulares de peso molecular de 185 kDa (IRS-1 e IRS-2). A associação/ativação da PI3-Kinase e o desligamento de proteínas Rab4 são fundamentais para que ocorra a translocação de vesículas intracelulares, ricas em proteínas transportadoras GLUT4.

Os tecidos insulino-sensíveis expressam uma isoforma de transportador de glicose específica chamada GLUT4. Em estado basal de concentração de insulina, apenas cerca de 10% do conteúdo total de transportador está presente na membrana plasmática destas células participando, junto com a isoforma GLUT1, da captação basal de glicose. Nesta condição, cerca de 90% do GLUT4 está estocado, como parte constitutiva de vesículas intracelulares encontram associadas a elementos túbulo-vesiculares (TVE) e à rede trans-Golgi (TGN) no meio intracelular (32). Sob estímulo insulínico, após a transdução do sinal, ocorre rápida translocação das vesículas intracelulares que se fundem à membrana plasmática; assim, aumenta rapidamente a densidade de GLUT4 na membrana plasmática, permitindo um incremento de até 30 vezes no transporte de glicose. Cessado o estímulo insulínico, ocorre a internalização de GLUT4, através da endocitose de fragmentos de membrana plasmática na forma de vesículas, reduzindo a capacidade de transporte de glicose (33).

#### AVANÇOS NO CONHECIMENTO DO PAPEL DA GLÂNDULA PINEAL NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Pelo anteriormente descrito, parece evidente que a glândula pineal desempenha uma função fisiológica

regulatória no metabolismo de carboidratos, influenciando não só a secreção mas, principalmente, a ação da insulina. Nos últimos anos, temos realizado vários estudos que não apenas confirmam o conceito de que a glândula pineal modula a homeostase dos carboidratos, mas também quais etapas do mecanismo de ação da insulina estão envolvidas.

Muitos de nossos estudos baseiam-se na análise de parâmetros relacionados com a homeostasia dos carboidratos em ratos Wistar submetidos a pinealectomia cirúrgica (PINx). Verificamos que não houve desenvolvimento de obesidade 4 (34) ou 6 (35) semanas após pinealectomia. Pelo contrário, embora o peso corporal não tenha variado em comparação ao de animais "sham" operados, o peso do coxim periepididimal (WAT) e do tecido adiposo marrom interescapular (BAT) era significativamente menor nos animais PINx (34), sem que houvesse alterações no peso da massa magra, isto é, em músculo gastrocnêmio (GAST) e coração (CM) (34).

Em ratos PINx, detectamos perda do ritmo diário na resposta a uma sobrecarga glicídica durante um teste de tolerância à glicose endovenosa (GTT). Em ratos PINx, tanto às 8:00h como às 16:00h, houve diminuição no índice  $\Delta$ insulina/ $\Delta$ glicose, durante os primeiros 5 min após a sobrecarga glicídica, o que sugere menor capacidade dos ratos PINx secretarem

insulina frente ao secretagogo glicose (35). Além disso, durante o GTT, as variações nas concentrações de glicose e insulina foram semelhantes em animais controles e PINx às 8:00h; porém, às 16:00h, a glicemia permaneceu mais elevada durante os primeiros 20min de teste nos animais PINx, enquanto a secreção de insulina foi significativamente menor até 45min de teste (35). Estes dados indicam que a pinealectomia promoveu diminuição na capacidade de secreção de insulina, induzida pela glicose *in vivo*, além de uma provável diminuição na sensibilidade periférica à ação do hormônio. De fato, a resistência à insulina foi comprovada *in vivo* em outro estudo, no qual observamos, às 12:00h, que ratos PINx apresentam significativa redução na glicemia (15%), na vigência de insulinemia levemente aumentada, o que determinou um índice G/I significativamente menor que em animais controle (34). A redução de glicemia observada nos ratos PINx, pode ser conseqüência de uma alteração no comportamento alimentar dos animais, os quais podem ter antecipado o período de maior ingestão na noite anterior. Entretanto, considerando o seu estado de resistência à insulina, é possível que com a evolução da privação alimentar essa diferença desapareça, conforme observado às 16:00 horas.

A resistência à insulina após PINx foi confirmada *in vitro* por estudos que avaliaram a capacidade de adipócitos isolados captarem 2-deoxi-D-glicose (2DG) sob estímulo com insulina. Em adipócitos de ratos PINx, o transporte máximo de 2-DG, estimulado por insulina, foi 33% menor que o observado em adipócitos de ratos normais, sem entretanto haver diferenças no transporte basal ou na EC<sub>50</sub>. Estes resultados foram observados tanto em experimentos realizados às 8:00h como às 16:00h (35).

Em outro estudo, avaliamos o conteúdo da proteína transportadora de glicose GLUT4 presente nos tecidos insulino-sensíveis (WAT, BAT, GAST, CM). Verificamos que em todos os tecidos, o conteúdo de GLUT4 era significativamente menor (48% a 71%) em ratos PINx (34), quer fossem os resultados expressos em termos de conteúdo relativo (por mg de proteína submetida à eletroforese) ou absoluto (por tecido inteiro). Além disto, observamos que no WAT de ratos PINx, a redução no GLUT4 era detectada tanto em fração de membrana plasmática, como em fração microssomal que representa o conteúdo de transportador capaz de ser translocado sob estímulo com insulina (34).

Mais recentemente, para investigar a redução no conteúdo tecidual de GLUT4 de ratos pinealectomizados, quantificamos o mRNA do GLUT4. Ver-

ificamos que a pinealectomia promoveu uma redução no mRNA do GLUT4 em WAT, BAT e músculo solear (SOL), sem, entretanto, alterar o conteúdo de mRNA do GLUT4 em músculo extensor digital longo (EDL), GAST e CM (36). Comparando estes dados com os obtidos em relação ao conteúdo da proteína GLUT4, pode-se concluir que a pinealectomia promove uma regulação tanto transcricional como pós-transcricional no gene do GLUT4, a qual é tecido específica (36).

A contribuição de nossos estudos sobre as alterações do metabolismo de carboidratos em ratos PINx está resumida na tabela 1.

Considerando que todos os dados até aqui descritos demonstram o efeito da pinealectomia sobre a homeostasia dos carboidratos, outros estudos foram realizados com o objetivo de verificar se essa modulação se dá através da ação da melatonina.

Em células adiposas incubadas com melatonina (10nM), durante 4h, e então submetidas a ensaio de captação de 2-DG estimulada por diferentes concentrações de insulina, foi demonstrado que a EC<sub>50</sub> diminuiu, sem alterar a capacidade de transporte máximo, ou o número e a afinidade dos receptores de insulina (37). Esses dados indicam que a melatonina promoveu aumento da sensibilidade dos adipócitos à insulina, provavelmente por modular etapas pós-receptor do mecanismo de ação da insulina.

A capacidade da melatonina alterar a translocação de GLUT4 estimulada por insulina também foi investigada. Observamos que adipócitos isolados e submetidos a estímulo máximo de insulina durante 30 min, na presença ou ausência de melatonina, não apresentam diferença quanto ao conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática (38). Similarmente, a pré-incubação de adipócitos com melatonina (4h) com posterior estímulo máximo com insulina durante 30 min, não altera o conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática (38). Estes dados estão de acordo com a observação de que a melatonina, *in vitro*, diminuiu a EC<sub>50</sub> sem alterar o transporte máximo de 2-DG estimulado por insulina.

Por outro lado, o papel da melatonina ficou bastante claro em estudo crônico, no qual ratos pinealectomizados foram submetidos a tratamento de reposição com melatonina e comparados com ratos submetidos a reposição com veículo (15 dias de tratamento). Nesta investigação, verificamos que a melatonina restaurou o conteúdo de GLUT4 no tecido adiposo branco, o qual permaneceu reduzido nos ratos que receberam apenas veículo (38).

Estes dados sugerem que as modulações previamente observadas são decorrentes da ausência de melatonina. Os resultados sobre o efeito direto da melatonina no metabolismo de carboidratos estão resumidos na tabela 2.

Em síntese, os vários estudos aqui relatados evi-

denciam um importante papel da glândula pineal na modulação da homeostasia de carboidratos. Essa regulação parece ser dependente da melatonina e pode ser resumida, até o presente momento, como aumento da sensibilidade tecidual à insulina que envolve alterações na expressão gênica da proteína transportadora GLUT4.

**Tabela 1.** Parâmetros morfométricos e metabólicos de ratos pinealectomizados.

• Parâmetros morfológicos		
Peso corporal (refs. 34,35)	NS	
Peso Tecidual (ref. 34) CM, GAST WAT, BAT	NS ↓	
Volume do adipócito	NS	
• Sensibilidade à insulina <i>in vivo</i>		
Glicemia basal (ref. 34)	↓	
Insulinemia basal (ref. 34)	NS	
Índice glicose/insulina (ref. 34)	↓	
Resposta ao GTT (ref. 35)	8:00h	16:00h
Glicemia	NS	↑
Insulinemia	NS	↓
Responsividade pancreática	↓	↓
• Sensibilidade à insulina <i>in vitro</i>	8:00h	16:00h
Receptor de insulina (ref. 35)		
número	NS	NS
afinidade	NS	NS
Fosforilação insulino-induzida da pp185 (ref. 35) em músculo esquelético e fígado	NS	NS
Captação insulino-induzida de 2-DG (ref. 35)		
Basal	NS	NS
Máxima	↓	↓
EC <sub>50</sub>	NS	NS
• Proteína transportadora de glicose GLUT4		
Conteúdo de proteína GLUT4 (ref. 34)		
Relativo (por mg de proteína)	CM, GAST	↓
Total (por tecido inteiro)	WAT, BAT	↓
mRNA do GLUT4 (ref. 36)	CM, GAST, EDL WAT, BAT, SOL	NS ↓

Os tecidos investigados foram: tecidos adiposos branco periepididimal (WAT) e marrom interescapular (BAT); músculos gastrocnêmio (GAST), solear (SOL), extensor digital longo (EDL) e cardíaco (CM). NS: não se alterou; ↑: aumentou; ↓: diminuiu.

**Tabela 2.** Ações da melatonina no metabolismo de carboidratos.

• Adipócitos isolados e pré-incubados com melatonina durante 4h (ref. 37)	
Receptor de insulina número e afinidade	NS
Captação de 2-DG estimulada com insulina basal e máxima	NS
EC <sub>50</sub>	↓
• Adipócitos isolados e pré-incubados com melatonina durante 4h (ref. 38)	
Conteúdo de GLUT4 em membrana plasmática sem estímulo com insulina	NS
com estímulo com insulina	NS
• Ratos pinealectomizados e tratados com melatonina durante 15 dias (ref. 38)	
GLUT4 em membrana plasmática	↑

NS: não se alterou; ↑: aumentou; ↓: diminuiu.

## REFERÊNCIAS

1. Bartness TJ, Goldman BD. Mammalian Pineal melatonin: a clock for all seasons. **Experientia** 1989;45:946-54.
2. Sugden, D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland. **Experientia** 1989;45:922-31.
3. Armstrong SM. Melatonin: the internal "zeitgeber" of mammals. **Pineal Res Rev** 1989;7:157-202.
4. Carneiro RCG, Cipolla-Neto J, Markus RP. Diurnal variation of the rat vas deferens contractions induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. **J Pharmacol Exp Ther** 1991;259:614-9.
5. Cipolla-Neto J, Abdalla DSP, Markus RP, Campa A. Temporal profile of superoxide dismutase activity in the pineal gland and liver. In: Fraschini F, Reiter RJ, eds. **Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation**. New York. 1991:181-4.
6. Vaughan M, Vaughan GM. Metabolic and thyroidal consequences of melatonin administration in mammals. In: Yu H-S, Reiter RJ, eds. **Melatonin**. CRC Press:Boca Raton. 1993:311-42.
7. Milcu SM, Nanu-Ionescu I, Milcu, I. The effect of pinealectomy on the plasma insulin rats. In: Wolfensholme GEW, Knight J, eds. **The Pineal Gland**. Edinburg:Churchil Livingstone. 1971:345-57.
8. Alcozer G, Giordano G, Masciocco D. Suddi sull'epifisis: influenza dell'estrato acquoso de pineale su alcuni aspetti del metabolismo glicidico in soggetti sani ed eucrinici. **Arch Patol Clin Med** 1956;12:1105-13.
9. Diaz B, Blasquez E. Effect of pinealectomy on plasma glucose, insulin and glucagon levels in the rat. **Horm Metab Res** 1986;18:225-9.
10. Csaba G, Barath P. Are Langerhans' islets influenced by the pineal body? **Experientia** 1971;27:962-2.
11. Pauly JE, Scheving LE. Circadian rhythms in blood glucose and the effect of different lighting schedules, hypophysectomy, adrenal medullectomy and starvation. **Am J Anat** 1967;120:627-36.
12. Jarrett RJ. Rhythms in insulin and glucose. In: Kriegger DT, ed. **Endocrine Rhythms**. New York:Raven. 1979:247-58.
13. Whichlow MJ, Sturge RA, Keen H, Jarrett RJ, Stimmier L, Grainger S. Diurnal variation in response to intravenous glucose. **Br Med J** 1974;1:488-91.
15. Ben-Dyke R. Diurnal variation of oral glucose tolerance in volunteers and laboratory animals. **Diabetologia** 1971;7:156-9.
16. Gibson T, Jarret RJ. Diurnal variation in insulin sensitivity. **Lancet** 1972;2:947-8.
17. Gibson T, Stimmier L, Jarret RJ, Rutland P, Shiu M. Diurnal variation on the effects of insulin on blood glucose, plasma non-sterified fatty acids and growth hormone. **Diabetologia** 1975;11:83-8.
18. Scalera G, Benassi C, Porro C.A. Pineal involvement in the alimentary behavior and taste preferences in the rat. **Physiol Behav** 1990;48:97-101.
19. Oxenkrug GF, McIntyre IM, Gershon S. Effects of pinealectomy and aging on the serum corticosterone circadian rhythms in rats. **J Pineal Res** 1984;1:181-5.
20. Bruckdorfer KR, Wang SS, Khan IH, Burne AR, Yudkin J. Diurnal changes in the concentrations of plasma lipids, sugars, insulin, corticosterone in rats fed diets containing various carbohydrates. **Horm Metab Res** 1974;6:99-106.
21. Zimmet PZ, Wall JR, Rome R, Stimmer L, Jarret RJ. Diurnal variation in glucose tolerance: associated changes in plasma insulin, growth hormone and non-sterified fatty acids. **Br Med J** 1974;1:485-8.
22. Gorry KC, Quay WB, Ewart RB. Effects of pinealectomy and pineal incubation medium and sonicates on insulin release by isolated pancreatic islets in vitro. **Horm Metab Res** 1979;11:432-6.
23. Frankel BJ, Strandberg MJ. Insulin release from isolated mouse islets in vitro: no effect of physiological levels of melatonin or arginine vasotocin. **J Pineal Res** 1991;11:145-8.
24. Williams LM, Hannah LT, Adam CL, Bourke DA. Melatonin receptors in red deer fetuses. **J Reprod Fertil** 1997;110:145-51.
25. Godson C, Reppert SM. The Mel<sub>1a</sub> melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. **Endocrinology** 1997;138:397-404.
26. Zawallch WS. Signal transduction in pancreatic B-cells: regulation of insulin secretion by information flow in the phospholipase C/protein kinase C pathway. **Front Biosci** 1997;2:160-72.
27. Carneiro RCG, Toffoletto O, Cipolla-Neto J, Markus RP. Sympathetic neurotransmission modulation by melatonin. **Eur J Pharmacol** 1994;257:73-7.
28. Massague J, Czech MP. Role of disulfides in the subunit structure of insulin receptor. Reduction of class I disulfides does not impair transmembrane signaling. **J Biol Chem** 1982;257:6729-38.
29. Kasuga M, Zick Y, Blith DL, Karlsson FA, Haring HU, Kahn CR. Insulin stimulation of phosphorylation of the beta subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. **J Biol Chem** 1982;257:9891-4.
30. Myers Jr MG, White MF. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. **Diabetes** 1993;42:643-50.
31. Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. **Mol Cell Biol** 1994;14:4902-11.
32. Araki E, Lipos MA, Patti MA, Bruning JC, Haag B, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with target disruption of the IRS-2 gene. **Nature** 1994;372:186-90.
33. Rea S, James DE. Perspective in Diabetes - Moving GLUT4 - The biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. **Diabetes** 1997;46:1667-77.
34. James DE, Strube M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. **Nature** 1989;338:83-7.
35. Seraphim PM, Bartol I, Cipolla-Neto J, Machado UF. Quantification of GLUT4 transporter in insulin-sensitive tissues from pinealectomized rats. In: Webb SM, Puig-Domingo M, Moller M, Pévet P, eds. **Pineal Update: From**

**Molecular Mechanisms to Clinical Implications.** Westbury:PJD Publications Ltd. 1997:99-106.

36. Lima FB, Machado UF, Bartol I, Seraphim PM, Sumida DH, Moraes SMF, et al. Pinealectomy causes glucose intolerance and decreases adipose cell responsiveness to insulin in rats. **Am J Physiol** 1998; 275:E934-41.
37. Sumida DH, Seraphim PM, Skorupa AL, Bellot LG, Cipolla-Neto J, Machado UF. The role of the pineal gland in GLUT4 gene expression. **8<sup>th</sup> Meeting of the European Pineal Society Colloquium 1999**;(abstract):pp156.
38. Lima FB, Matsushita DH, Hell NS, Dolnikoff MS, Okamoto MM, Cipolla-Neto J. The regulation of insulin action in isolated adipocytes. Role of the periodicity of food intake, time of day and melatonin. **Braz J Med Biol Res** 1994;27:995-1000.

39. Nishide FY, Sumida DH, Okamoto MM, Skorupa AL, Cipolla-Neto J, Machado UF. The short- and long-term effect of melatonin on glucose transporter GLUT4. **8<sup>th</sup> Meeting of the European Pineal Society Colloquium 1999**;(abstract):pp157.

**Endereço para correspondência:**

Ubiratan Fabres Machado  
Depto. de Fisiologia e Biofísica, ICB/USP  
Av. Prof. Lineu Prestes 1524  
05.508-900 São Paulo, SP  
Fax: (11) 818-7285  
e.mail: ubiratan@fisiio.icb.usp.br