



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA

**Administração da melatonina exógena sobre a histofisiologia renal e
estresse oxidativo em ratos adultos induzidos ao diabetes**

RECIFE

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA

**Administração da melatonina exógena sobre a histofisiologia renal e
estresse oxidativo em ratos adultos induzidos ao diabetes**

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociência
Animal da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre em
Biociência Animal. Área de
Morfofisiologia.**

Orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientador (es):

Prof.^a Dr.^a Valéria Wanderley Teixeira

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

RECIFE

2015

Ficha Catalográfica

F383a Ferreira, Cintia Giselle Martins
Administração da melatonina exógena sobre a
histofisiologia renal e estresse oxidativo em ratos adultos
induzidos ao diabetes / Cintia Giselle Martins Ferreira. –
Recife, 2015.
98 f.: il.

Orientador (a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Dissertação (Pós-Graduação em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal,
Recife, 2015.
Referências.

1. Diabetes 2. Estresse oxidativo 3. Apoptose 4. Melatonina
5. Histofisiologia renal I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho,
orientador II. Título

CDD 591.4

CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA

**Administração da melatonina exógena sobre a histofisiologia renal e
estresse oxidativo em ratos adultos induzidos ao diabetes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Aprovada em 27 de Fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves – CPqAM/FIOCRUZ – LIKA/UFPE

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a Deus e à minha família, em especial ao meu pai, Severino João Ferreira Júnior, incentivador dos meus sonhos e que está ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Dedico também à minha avó, Lindaura de Moura Ferreira (*in memoriam*).”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir essa conquista, sem Ele jamais teria chegado até aqui. Obrigada meu Pai, por todo amor e por acalantar o meu coração nos momentos mais difíceis.

À minha avó, Lindaura Ferreira, que mesmo não estando mais presente, foi a pessoa mais importante da minha vida, escolhida por Deus para cuidar e me educar.

Ao meu pai, Severino Júnior, que é muito importante para mim e meu exemplo de força e paciência. Agradeço pela dedicação, esforço, amor e cuidado.

À minha família, agradeço pelo apoio, amor, incentivo e compreensão. À minha tia Carmelita Moura, o meu tio Gilvamberto Leite e às minhas primas Érica e Letícia Leite, ao meu irmão Igor Ferreira e a meu avô Severino Ferreira. Muito obrigada a todos, vocês são demais! .

Aos professores Álvaro Teixeira e Valéria Teixeira, meu muito obrigada pela oportunidade no laboratório e pela orientação, tão essenciais para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente ao professor Leucio Duarte, que esteve sempre de prontidão a nos ajudar nesse trabalho, abrindo as portas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal (LFFR) da UFPE. Agradeço pela paciência, atenção e disponibilidade, assim como agradeço também aos membros do LFFR: Juliane Farias, Regina Ayres, Edjair Cabral, Valdilene Silva e o técnico Nielson Rodrigues, meu muito obrigada pela receptividade e ajuda!

Meu imenso agradecimento aos professores Valdemiro Amaro e Frederico Maia , pela paciência, disponibilidade e todo auxílio para a análise das lâminas. Muito obrigada!

Aos bioteristas André e Renata, pelo cuidado com os animais, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos meus companheiros do laboratório de Histologia: Fernanda Ângelo, Jeanine Lemos, Ilka Duarte, Lílian Pereira, Laíse Souza, Marta Sarinho, Cristiane Silva, Raionir Ricardo, Franklin Magliano (em especial pelo auxílio nas dosagens), Thiago Alves, Hilton Nobre, Clovis Lapa, Lécio Leone, Bárbara

Brooklyn, Yuri Albuquerque, Marina Baptista, muito obrigada pelo carinho, apoio e por tornar o ambiente de trabalho tão agradável!

Carolline Guimarães, Aline Mariano, Hilda Santos, Solange Bezerra, Welma Emídio: minha imensa gratidão pela paciência, amizade, palavras de conforto e incentivo! Vocês são incríveis!

Em especial, agradeço aquela que foi as minhas mãos e os meus pés neste trabalho, sempre se prontificando a me ajudar: Ismaela Melo. Muito obrigada por TUDO mesmo, de coração. Obrigada pelo apoio, palavras de incentivo, momentos agradáveis e pela imensa amizade. Você é uma pessoa maravilhosa!

Àgradeço às amigas de turma de graduação e de sempre: Fernanda Miguel, Shimene Figueirôa, Rebeka Alves, Bruna Souto e Érika Gomes. Obrigada pela amizade e carinho!

Aos amigos de mestrado, pelos momentos juntos e por tornar as disciplinas bem mais legais!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) pela oportunidade e por conceder as instalações para a realização deste trabalho.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Meu obrigada também àqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço de coração a José Carlos, meu namorado e companheiro de todas as horas. Muito obrigada por estar ao meu lado sempre, pela paciência nos momentos mais difíceis e de ansiedade, apoio, amor, compreensão e confiança.

Muito obrigada a todos! Sem vocês, com certeza eu não chegaria até aqui!

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos.”

Elleanor Roosevelt

RESUMO

A nefropatia associada ao diabetes mellitus é uma das mais sérias e comuns complicações microvasculares do diabetes tipo 1 e tipo 2 e os seus efeitos nos rins são principalmente resultantes da hiperglicemia. O objetivo do trabalho foi avaliar se a administração da melatonina pode neutralizar os efeitos adversos da nefropatia diabética induzida pela estreptozotocina, melhorando diretamente características como função renal, pressão arterial e o estresse oxidativo. Para tanto, foram utilizados 50 ratos albinos, divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução ao diabetes; GD: ratos induzidos ao diabetes e tratados com placebo; GDM: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg durante 20 dias; GDMS: ratos induzidos ao diabetes e tratados simultaneamente com melatonina; GDI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina na dose de 5U/dia durante 20 dias. Os resultados mostraram que a administração da melatonina simultaneamente a indução do diabetes foi capaz de produzir efeitos benéficos nas alterações encontradas nos animais diabéticos, atuando de maneira positiva ao reduzir o peso dos rins e o índice organossomático, tendência a redução dos valores hiperglicêmicos, proteção das células beta pancreáticas refletidos nos valores de insulina, recuperação dos níveis plasmáticos do óxido nítrico, bem como minimizou as alterações histológicas, reduzindo também o acúmulo de glicogênio e colágeno nos rins desses animais. Além disso, os valores de creatinina e uréia apresentaram-se equivalentes aos dos animais do grupo controle. Melatonina também reduziu os níveis de TBARS e a taxa de células apoptóticas. No entanto, não interferiu significativamente sobre os níveis da GSH, ganho de peso corporal e pressão arterial. Assim, concluímos que a administração da melatonina simultaneamente a indução do diabetes atuou de maneira benéfica sobre a histofisiologia renal de animais com o quadro de nefropatia diabética, comprovando sua capacidade antioxidante e protetora sobre os rins.

Palavras-chave: diabetes, estresse oxidativo, apoptose, melatonina, histofisiologia renal

ABSTRACT

Nephropathy associated with diabetes mellitus is one of the most serious and common microvascular complications of type 1 diabetes and type 2 and its effects are primarily on the kidney resulting from hyperglycemia. The objective was to evaluate whether the administration of melatonin may neutralize the adverse effects of diabetic nephropathy streptozotocin-induced, improving directly characteristics as kidney function, blood pressure and oxidative stress. Therefore, 50 albino rats were divided into the following groups were used: GC: mice without inducing diabetes; GD: STZ-induced rats and treated with placebo; GDM: STZ-induced rats and treated with melatonin at a dose of 10mg /kg for 20 days; GDMS: STZ-induced rats and treated simultaneously with melatonin; GDI: STZ-induced rats treated with insulin at a dose of 5 U /day for 20 days. The results showed that administration of melatonin simultaneously induction of diabetes was able to produce beneficial effects on the changes seen in diabetic animals, acting positively to reduce the weight of the kidneys and the organosomatic index, tend to reduce the hyperglycemic values, protection of pancreatic beta cells reflected in insulin values, recovery of plasma levels of nitric oxide, as well as minimized the histological changes also reduce the accumulation of glycogen and collagen kidney of these animals. Furthermore, the values of creatinine and urea showed to be comparable to those of the control group animals. Melatonin also reduced the TBARS and the rate of apoptotic cells. However, did not interfere significantly on the GSH levels, body weight gain and blood pressure. Thus, we conclude that the administration of melatonin simultaneously diabetes induction acted beneficially on renal histophysiology animals with diabetic nephropathy frame, proving its antioxidant capacity and protective on the kidneys.

Keywords: diabetes, oxidative stress, apoptosis, melatonin, renal histophysiology

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia..... 32

Figura 2. Via metabólica da síntese de melatonina..... 36

CAPÍTULO II

Figura 1. Gráfico do ganho de peso dos animais ao longo do período experimental (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)..... 82

Figura 2. Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)..... 83

Figura 3. Índice organossomático (IO) dos rins dos animais após 20 dias de tratamento dos diferentes grupos experimentais (%). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$). 84

Figura 4. Níveis plasmáticos de uréia (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações.* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....85

Figura 5. Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....86

Figura 6. Níveis pressóricos dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (mmHg). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. * Teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....87

Figura 7. Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos experimentais. A – grupo controle; (B – D) – grupo diabético – (E-F) – grupo diabético melatonina simultânea; (G e H) – grupo diabético insulina; GL – glomérulo; TP – tubulo contorcido proximal; TD – túbulo contorcido distal; * - glomerulite membranoproliferativa; GA – glomérulo atrófico; seta branca – atrofia tubular; N- nefrose tubular; Ab – albuminúria; seta vermelha – degeneração hidrópica; M – Região medular; cc –congestão.....88

Figura 8. Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos experimentais. (A – B) – grupo diabético melatonina simultânea; (C – D) – grupo diabético insulina; GL – glomérulo; TP – túbulo contorcido proximal; TD – túbulo contorcido distal; M – Região medular.....89

Figura 9. Fotomicrografia da histoquímica dos rins. (A) – grupo controle; (B) – grupo diabético; (C) – grupo diabético melatonina; D- grupo diabético melatonina simultânea; (E) – grupo diabético insulina. Coloração:Tricômico de Gomori. Marcação azul, fibras colágenas.....90

Figura 10. Histoquímica dos rins dos grupos experimentais. (A) - grupo controle; (B - C) – grupo diabético; (D) – grupo diabético melatonina; (E) – grupo diabético melatonina simultânea; (F) – grupo diabético insulina; * - albuminúria; Coloração P.A.S. Marcação em vermelho, glicopolissacarídeos.....91

Figura 11. Glomérulos renais mostrando podócitos Túnel-positivos (setas) dos grupos experimentais. (A)- grupo controle; (B) - grupo diabético; (C) – grupo diabético melatonina; (D) – grupo diabético melatonina simultânea; (E) - grupo diabético insulina. Contra –coloração: Hematoxilina.....92

Figura 12. Índice apoptótico (IA) nos glomérulos renais. *Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....93

Figura 13. Valores de TBARS nos rins dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....94

Figura 14. Valores de GSH nos rins dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).....95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.....80

Tabela 2. Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (μmol de NO^{2-} / μmol de plasma). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Acetil-coA** – acetil coenzima A
- AGE** – produtos finais de glicação avançada
- ANG II** – angiotensina II
- AMPc** – adenosina monofosfato cíclico
- BSA** – albumina sérica bovina
- CAT** – catalase
- CTGF** – fator de crescimento do tecido conjuntivo
- DM** – diabetes mellitus
- DMG** – diabetes mellitus gestacional
- DMT1** – diabetes mellitus do tipo 1
- DMT2** – diabetes mellitus do tipo 2
- DTNB** - ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
- DRC** – doença renal crônica
- GADPH** – gliceraldeído-3-fosfato
- GLUTs** – transportadores de glicose
- GLUT1** – transportador de glicose do tipo 1
- GLUT2** – transportador de glicose do tipo 2
- GMPc** – guanosina monofosfato cíclico
- GSH** – glutatona reduzida
- GSH-Px** – glutatona peroxidase
- GSH -Rd** – glutatona redutase
- HAS** –hipertensão arterial sistêmica
- 5 – HTP** – 5 –hidroxitriptofano
- 5- HTPD** – 5 – hidroxitriptofano descarboxilase

IA – índice apoptótico

IO – índice organossomático

IRC – insuficiência renal crônica

IP3 – inositol fosfato

KCL -cloreto de potássio

MAPK – proteína quinase ativadora de mitogênese

MT1 – receptor de melatonina tipo 1

MT2 – receptor de melatonina tipo 2

NAS – N- acetilserotonina

NAT – N- acetiltransferase

NEED - dicloridrato de naftiletilenodiamina

NF –kB – fator de transcrição nuclear

ND – nefropatia diabética

NO – óxido nítrico

PARP – poli (ADP-ribose) polimerase

PAS – ácido periódico de schiff

PBS – tampão fosfato salino

PKC – proteína quinase C

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDS - dodecil sulfato de sódio

SOD – superóxido-dismutase

STZ – estreptozotocina

TBARS – ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TdT – desoxinucleotídeo terminal transferase

TFG – taxa de filtração glomerular

TGF- β – fator de crescimento transformante Beta 1

THP – triptofano hidroxilase

TRIS – tris (hidroximeti) aminometano

VEGF – fator de crescimento vascular

SUMÁRIO

Preâmbulo		Pág.
	RESUMO.....	VIII
	ABSTRACT.....	XIX
	LISTA DE FIGURAS.....	X
	LISTA DE TABELAS.....	XIV
	LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XV
 Capítulos		
I	1. INTRODUÇÃO.....	20
	2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
	2.1. Diabetes Mellitus.....	21
	2.2. Os rins.....	25
	2.3. Nefropatia diabética.....	27
	2.4. Estresse oxidativo e diabetes mellitus.....	30
	2.5. Hipertensão arterial e diabetes mellitus.....	33
	2.6. Melatonina e diabetes mellitus.....	35
	3. REFERÊNCIAS.....	38
II	Avaliação da melatonina exógena sobre os efeitos adversos da nefropatia diabética experimental.....	50
	RESUMO.....	50
	INTRODUÇÃO.....	51

MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	65
REFERÊNCIAS.....	71

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é um distúrbio crônico, caracterizado por alteração no metabolismo da glicose e outras substâncias energéticas, resultando tardiamente em complicações vasculares e neuropáticas, ou seja, é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia resultante de disfunções na secreção de insulina ou da perda progressiva de sua ação, ou ambos os fatores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; SHERWIN, 2000). A incidência do diabetes varia na população mundial. Segundo a Federação Internacional de Diabetes, a epidemia da doença continua a aumentar no mundo, com a impressionante marca em 2011 de 366 milhões de pessoas afetadas. No Brasil, estima-se que o número de pessoas afetadas pelo diabetes atinja 11.6 milhões até o ano de 2025 (MALERBI; FRANCO, 1992; KING; REWERS, 1993; KING; AUBERT; HERMAN, 1998; RESNIKOFF et al., 2004).

O estresse oxidativo parece ser o fator mais importante no aparecimento das complicações do diabetes (BONNEFONT-ROUSSELOT et al., 2000; DAVE; KALIA , 2007; FOX et al., 2004). Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem modular a função celular, sinalização de receptores e a resposta imune em condições fisiológicas. Porém a produção excessiva de ROS pode mediar danos epiteliais progressivos microvasculares causando alterações na matriz extracelular e apoptose em diversos tecidos (CAI; HARRISON, 2000; FERRINI et al., 2006; MCCANN et al., 2005; SCHMEICHEL et al., 2005).

Hakim; Pflueger (2010) relataram danos renais caracterizados por nefropatologias provocadas por excessos de ROS. Um entre trinta pacientes diabéticos desenvolve nefropatologia significativa onde o seu progresso termina com falência renal (HARTMANN; CZOCK; KELLER, 2010; REMUZZI; MACIA; RUGGENENTI, 2006). Em condições hiperglicêmicas a presença de proteinúria está correlacionada com extensa hipertrofia mesangial e baixa função glomerular, indicando assim, um dano renal (MAUER, 1994). Diabetes induzido experimentalmente por agentes químicos como a estreptozotocina e aloxana,

destrói as células β do pâncreas pela geração de excesso de ROS e produz lesões nos rins, similares a nefropatologia diabética humana (SZKUDELSKI, 2001; VANDER; JAGT et al., 2001).

A melatonina (N-acetil 5 metoxitriptamina) é o hormônio produzido pela glândula pineal, a partir do triptofano (NISHIDA et al., 2005; PADILLO et al., 2004; PEI; PANG; CHEUNG 2003). Este hormônio participa de um grande número de processos fisiológicos, tais como: regulação do ritmo circadiano e reprodução, sendo relatada também como um potente antioxidante (KILIC et al., 2004; NISHIDA et al., 2005). Estudos têm mostrado que a melatonina reduz o estresse oxidativo na retina, cérebro e fígado de ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina (PADILLO et al., 2004; RAO et al., 2002; SÁENZ et al., 2002). No entanto, poucos são os relatos da ação da melatonina sobre nefropatologia diabética. Assim, avaliaremos por meio de métodos imunológicos e histológicos se a melatonina também pode minimizar o desenvolvimento da nefropatologia diabética.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus

O envelhecimento populacional, a urbanização e especialmente o estilo de vida inadequado, caracterizado principalmente por má alimentação e sedentarismo, têm sido considerados como alguns fatores relacionados com o aumento na incidência de diversas enfermidades, dentre as quais, uma das mais prevalentes é o diabetes mellitus (JAHN, 2010; WILD et al., 2004).

O Diabetes Mellitus (DM) é um grave e crescente problema de saúde pública, com características epidêmicas, tanto em termos de número de pessoas afetadas e mortalidade prematura, como também, em relação aos custos envolvidos no seu controle e no tratamento das complicações vasculares específicas da doença (CERIELLO et al., 2009). Cerca de 350 milhões de pessoas no mundo são estimadas ter diabetes, onde a cada ano, aproximadamente 7 milhões de pessoas desenvolvem os sintomas da doença (DANAEI et al., 2011). Estimativas mostraram que em 2007 havia no Brasil

quase 7 milhões de pessoas com diabetes com idade variando de 20 a 79 anos (5,8% da população na mesma faixa etária), com projeção de aumento para 11,4% em 2025 (DANAIE et al., 2011).

O DM é caracterizado por um grupo de distúrbios metabólicos crônicos, resultante da condição de hiperglicemia, devido a deficiência na secreção de insulina pelas células β do pâncreas, ação da insulina, ou ambos os fatores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; OLIVEIRA et al., 2009). A classificação do DM inclui quatro classes clínicas, sendo baseada na sua etiologia e não pela forma de tratamento. Dessa maneira, o DM é classificado em: *Diabetes Mellitus* Tipo 1 (DMT1), *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DMT2), tipos específicos de *Diabetes Mellitus* e *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG); além disso, existe ainda a glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída, as quais são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; ZIMMET; ALBERT; SHAW, 2001).

O DMT1 acomete cerca de 5% a 10% dos casos de diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Sendo anteriormente conhecido pelos termos “diabetes insulino-dependente” ou “diabetes juvenil”, resulta na destruição das células β do pâncreas, levando a um quadro de insuficiência na produção ou secreção de insulina e envolve fatores genéticos, imunológicos e ambientais (ONENGUT-GUMUSCU; CONCANNON, 2002). A destruição das células pode ocorrer por um processo autoimune, levando a um quadro de insulite e presença de anticorpos (anti-descarboxilase de ácido glutâmico, anti-ilhotas e anti-insulina) ou por uma causa desconhecida, onde é observada a ausência de insulite e autoanticorpos, caracterizando a forma idiopática da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; GROSS et al., 2002; WAJCHENBERG, 1992). Embora o DMT1 seja reconhecido como uma doença que acomete crianças e adultos jovens, estudos epidemiológicos tem indicado uma incidência comparável em adultos (ONKAMO et al., 1999).

O DMT2 é a forma mais comum, representando 90% a 95% dos casos diagnosticados da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Previamente definida como diabetes não insulino-dependente ou diabetes do adulto, essa forma de acometimento inclui os indivíduos que apresentam um

quadro de resistência a insulina e uma resposta secretória de insulina compensatória inadequada. Esse aumento da resistência periférica à insulina se dá devido a defeitos na cascata de sinalização ou no próprio receptor de insulina. Sendo assim, os tecidos alvos não usam adequadamente a insulina com o efeito de fatores como a idade, obesidade e sedentarismo ou as células beta pancreáticas tornam-se progressivamente menos capazes de secretar insulina suficiente para manter a homeostase de carboidrato e lipídeo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; BELL; POLONSKY, 2001; SALTIEL; KAHN, 2002). O tratamento do DMT2 visa manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, prática de exercícios físicos ou uso de medicações como sensibilizadores da ação de insulina, anti-hiperglicemiantes, drogas anti-obesidade e/ou insulina, as quais podem ser utilizadas isoladamente ou em associações (ARAUJO; BRITTO; PORTO DA CRUZ, 2000).

Quando a hiperglicemia é detectada durante uma gestação, ocorre o que chamamos de diabetes gestacional. Esse tipo de diabetes é resultante de uma tolerância diminuída aos carboidratos e essa condição pode persistir ou não após o parto. Caso persista, determina-se então um quadro de DMT2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; BUCHANAN et al., 2007; GROSS et al., 2002; TERVAERT et al., 2010). Os outros tipos específicos de diabetes são ocasionados devido a defeitos genéticos na função das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes imuno-mediado (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; BALSELLS et al., 2015; GROSS et al., 2002).

A resistência à insulina ou sua ausência no organismo diminui a eficiência de utilização periférica de glicose e aumenta sua produção, elevando a glicemia. Os sintomas dessa hiperglicemia acentuada incluem: 1) polidipsia, onde o aumento da ingestão de líquido é resultante da redução de água intracelular devido à hiperosmolaridade e aumento crescente da glicemia; 2) poliúria, que é secundária à diurese osmótica pela glicosúria; 3) polifagia, que é o aumento da ingestão de alimento, dependente do aumento acentuado do catabolismo de proteínas e lipídios; 4) cetoacidose, por elevação dos ácidos

graxos livres, cuja oxidação hepática resulta em corpos cetônicos no plasma, resultando na cetoacidose diabética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2004; DIAS; SOARES; REZENDE, 2001; WAJCHENBERG, 1992).

Quando a hiperglicemia torna-se crônica, o substrato utilizado como fonte de energia passa a ser tóxico. Dessa maneira, a hiperglicemia da diabetes, a longo prazo, causa alterações micro e macrovasculares, levando ao acometimento de diversos órgãos e afetando a qualidade de vida dos portadores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; CORIGLIANO et al., 2006; LAGRANHA et al., 2007; MEHMET et al., 2008; SALIDO et al., 2013). Os danos microvasculares incluem principalmente os rins e a retina, sendo responsáveis, respectivamente, pela nefropatia e retinopatia diabética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; GROSS et al., 2002). A nível macrovascular, ocorre o acometimento coronariano e dos vasos sanguíneos, principalmente relacionados com o aumento da pressão arterial sistêmica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; LAGRANHA et al., 2007; SIMA; SUGIMOTO, 1999). Além disso, ocorre alteração nos nervos motores, sensoriais e autonômicos, caracterizando a neuropatia diabética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; MEHMET, 2008).

Ao longo dos anos, o modelo animal vem sendo extensamente utilizado para estudos do DM. A indução do DM com a droga estreptozotocina (STZ) promove danos semelhantes aos provocados pelo DMT1. Akbarzabeh et al. (2007) mostraram através de amostras do tecido pancreático de ratos normais e diabéticos que as células β nas ilhotas de Langerhans de ratos que receberam injeção com STZ foram claramente degeneradas, provocando o DM experimental. A STZ também altera o metabolismo normal em ratos diabéticos comparando com ratos normais. O consumo de água e alimentação, volume de urina e glicose sanguínea aumentam em animais diabéticos em comparação com ratos normais, enquanto os níveis de insulina e peso corporal diminuem (AKBARZABEH et al., 2007).

2.2 Os rins

Os rins são órgãos excretores, com morfologia classicamente definida em forma de grão de feijão e que apresentam uma borda convexa e outra côncava, na qual se situa o hilo, região por onde entram e saem vasos sanguíneos e linfáticos, entram nervos e saem os ureteres (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Histologicamente, o rim é constituído pela cápsula, de tecido conjuntivo denso e possui duas regiões distintas, a zona cortical e a zona medular (AIRES, 2008; BERNE et al., 2004; ROSS; PAWLINA, 2008).

Os rins retêm os materiais essenciais e removem do organismo substâncias prejudiciais ou não aproveitáveis. Eles são responsáveis pela manutenção e regulação da composição do líquido extracelular, e também são essenciais para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Funcionam como um órgão endócrino, pois sintetizam e secretam o hormônio glicoprotéico eritropoetina, que regula a formação das hemácias em resposta à diminuição da concentração de oxigênio no sangue. Além disso, são responsáveis pela síntese e secreção da protease ácida renina, uma enzima envolvida no controle da pressão arterial e do volume sanguíneo (AIRES, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

O néfron, considerado a unidade funcional do rim, consiste em uma porção dilatada, o corpúsculo renal e um sistema de túbulos (ROSS; PAWLINA, 2008), que incluem o túbulo contorcido proximal, partes delgadas e espessas da alça de Henle e o túbulo contorcido distal. O túbulo coletor conecta o túbulo contorcido distal aos fragmentos corticais ou medulares dos ductos coletores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O corpúsculo renal consiste de uma rede de capilares (o glomérulo), envolvido pela cápsula de Bowman. Esta cápsula possui dois folhetos, um interno ou visceral, junto aos capilares glomerulares, e outro externo, ou parietal, formando os limites do corpúsculo renal. O folheto parietal é constituído por epitélio simples pavimentoso, enquanto o folheto visceral apresenta células desenvolvidas, que são os podócitos. O espaço entre a camada visceral e a camada parietal é chamado de espaço subcapsular, que recebe o líquido filtrado através das

paredes dos capilares e do folheto visceral da cápsula (BERNE et. al., 2004; ROSS; PAWLINA, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O corpúsculo renal contém, ainda, um grupo de células denominadas células mesangiais. Tais células e sua matriz extracelular constituem o mesângio. As células mesangiais não estão inteiramente confinadas ao corpúsculo renal, algumas estão fora do corpúsculo ao longo do pólo vascular, onde também são chamadas de células reticuladas, e fazem parte do que é denominado aparelho justaglomerular (ROSS; PAWLINA, 2008). O aparelho justaglomerular é um componente do importante mecanismo de *feedback* que regula o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular. O aparelho justaglomerular é formado pela mácula densa, pelas células mesangiais extraglomerulares e pelas células granulares produtoras de renina na arteríola aferente (BERNE et al., 2004).

A ação coordenada dos vários segmentos dos néfrons determina a quantidade de substâncias contidas na urina. Há três processos gerais: 1) filtração glomerular, 2) reabsorção de substâncias do fluido tubular para o sangue, e 3) em alguns casos, secreção de substância do sangue para o fluido tubular. O primeiro passo na formação da urina pelos rins é a produção de um ultrafiltrado de plasma através dos glomérulos (BERNE et al., 2004).

A formação da urina começa com a filtração glomerular, que é o fluxo de líquido filtrado dos capilares glomerulares para dentro da cápsula de Bowman. O filtrado glomerular é muito parecido com o plasma sanguíneo. Entretanto, contém poucas proteínas. As grandes proteínas plasmáticas como albumina e células do sangue são excluídas durante o movimento pela barreira de filtração. O filtrado contém principalmente íons inorgânicos e solutos orgânicos de baixo peso molecular, praticamente nas mesmas concentrações que o plasma (EATON; POOLER, 2008).

O volume de filtrado formado por unidade de tempo é conhecido com a taxa de filtração glomerular (TFG). A capacidade de filtrar um enorme volume de plasma permite aos rins excretar grandes quantidades de produtos residuais e regular os constituintes do meio interno com muita precisão (EATON; POOLER, 2008).

A TFG é a soma das intensidades de filtração de todos os néfrons em funcionamento. Assim, a TFG é o índice da função dos rins. O conhecimento da TFG é essencial na avaliação da gravidade e do desenvolvimento da doença renal. Quando ocorre queda na TFG, geralmente, significa que a doença está progredindo, enquanto o aumento na TFG geralmente sugere o restabelecimento da função renal (BERNE; LEVY, 2000).

Dentre as doenças que mais afetam os rins está o diabetes mellitus e a hipertensão, que resultam na nefropatia diabética. São diferentes níveis de acometimento, porém, o quadro mais grave pode levar a insuficiência renal crônica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

2.3 Nefropatia diabética

A nefropatia associada ao DM é uma das mais sérias e comuns complicações microvasculares do diabetes tipo 1 e tipo 2, sendo considerada a principal causa de insuficiência renal crônica (IRC) e principal indicação para diálise e transplante (estágio terminal ou estágio dialítico da doença renal). Aproximadamente 30% dos pacientes com DM desenvolve nefropatia (USRDS, 2007). Na maior parte do mundo, essa complicação crônica do DM acomete cerca de 25% dos indivíduos com diabetes tipo 1 e de 5% a 10% com diabetes tipo 2 e está associada com o aumento de mortalidade cardiovascular (GROSS et. al., 2005; USRDS, 2007). De acordo com a AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2013), para diminuir o risco ou reduzir a progressão da nefropatia, recomenda-se a otimização do controle glicêmico e do controle da pressão arterial.

O principal determinante na gênese e progressão da ND é a hiperglicemia, processo que pode ser modificado por susceptibilidade genética e acelerado por outros fatores, especialmente a hipertensão arterial sistêmica, que envolve os fatores hemodinâmicos (GIUNTI et al., 2006; RENNO et al., 2008; ZINTZARAS; PAPATHANASIOU; STEFANIDIS, 2009). Os efeitos nos rins ocorrem especificamente nos glomérulos, foco principal de lesão na ND (LAGRANHA, 2007) e a evolução da doença apresenta diferentes estágios. Primeiramente, ocorre uma hiperfiltração glomerular, com aumento do tamanho

do rim (nefromegalia), porém, sem a identificação de outros sintomas clínicos. Em seguida, o estágio silencioso, sendo caracterizado por um aumento na membrana basal glomerular e proliferação das células mesangiais. No terceiro estágio, ocorre o que se chama de microalbuminúria ou nefropatia incipiente, com aumento na excreção urinária de albumina (30-300mg/dL), que geralmente aparece cerca de 5-15 anos após o diagnóstico do DM (ALSAAD; HERZENBERG, 2007; COOPER 2001; MOLITCH et al., 2003; SUSZTAK et al., 2006) acompanhada por aumento na pressão arterial sistêmica e glomerular, e posterior redução na filtração glomerular. Ocorre, ainda, mais um aumento na excreção de albumina, considerado como macroalbuminúria ou nefropatia clínica (300 mg/dL, 200 mg/min ou >200 mg/g de creatinina na urina), pode progredir para insuficiência renal (taxa de filtração glomerular <60 mL/min, correspondendo a creatinina sérica >1,5 mg/dL em homens e >1,3 mg/dL em mulheres), definindo a presença de doença renal crônica em pacientes diabéticos (CHOBANIAN et al., 2003; SUSZTAK et al., 2006; WOLF; ZIYADEH, 2005). Além do que, albuminúria, em vários graus (2-20 mg/dL a 30-300 mg/dL), é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares, em indivíduos com ou sem DM (GERSTEIN et al., 2001).

Vias metabólicas dependentes de glicose, como aumento do estresse oxidativo, formação de poliol e acúmulo de produtos finais da glicosilação avançada (AGE), são ativadas no rim diabético. Os fatores hemodinâmicos incluem aumento na pressão sistêmica e intraglomerular e ativação de várias vias de hormônios vasoativos como o sistema renina-angiotensina e endotelina (COOPER, 2001). Assim como, os fatores hemodinâmicos, independentemente ou associados com vias metabólicas, ativam mensageiros secundários como isoformas da proteína quinase C (PKC) e MAPK (proteína quinase ativadora da mitogênese), fatores de transcrição nuclear como NF-kB e os de crescimento, como o TGF- β (fator de crescimento transformante beta 1, além do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) e CTGF (fator de crescimento do tecido conjuntivo). Em resposta à hiperglicemia, aos AGEs e PKC, as citocinas pró-fibróticas TGF- β e CTGF, aumentam significativamente no DM exercendo importante papel na progressão da nefropatia diabética, uma vez que aumentam o acúmulo de matriz extracelular por meio do estímulo de produção

de colágeno IV e fibronectina, resultando em fibrose intersticial e glomeruloesclerose (COOPER, 2001; ROCCO et al. 1992; ZHOU et al., 2004).

O diabetes seletivamente lesa células cujo transporte de glicose não se reduz com a hiperglicemia, como é o caso das células mesangiais, endoteliais da retina e neurônios de nervos periféricos, acarretando maior concentração intracelular de glicose (LAGRANHA, 2007). As células mesangiais glomerulares apresentam importante papel na estrutura e manutenção da função fisiológica dos glomérulos. Nessas células, assim como na maioria das células, a glicose entra pelo mecanismo de difusão facilitada, através de proteínas integrais de membrana específicas, os transportadores de glicose (GLUTs) (GOULD; HOLMAN, 1993). Estudos com células mesangiais *in vitro* demonstraram maior expressão de GLUT1 em meios com alta concentração de glicose, maior atividade da PKC e conseqüente estímulo à síntese de proteínas da matriz extracelular (HENRY et al., 1999). Dessa forma, diferentes estudos associam que quanto maior a concentração de glicose, maior a expressão dos transportadores GLUT1 e GLUT2 e conseqüentemente maior a glicose intracelular.

Os danos renais também ocorrem na barreira de filtração glomerular, que é um complexo biológico de estruturas com propriedades que permitem a alta taxa de filtração de água, a passagem irrestrita de moléculas de tamanhos pequeno e médio, e restrição à passagem de albumina e proteínas maiores (HARALDSSON et al., 2008). A barreira de filtração glomerular é composta pelo endotélio fenestrado glomerular, a membrana basal glomerular (MBG) e os podócitos. Estudos recentes indicam que agressões aos podócitos representam um importante fator no desencadeamento de todas as formas de glomerulopatia (BARISONI et al., 2009; KRIZ; LEHIR, 2007; WIGGINS et al., 2005) e apresentam papel essencial no desenvolvimento da ND (LI et al., 2007; MARSHALL, 2007; REDDY et al., 2008; ZIYADEH; WOLF, 2008).

A causa exata da perda de podócitos no DM permanece especulativa. Porém, estudos recentes com cultura de podócitos exposta a alta glicose e com modelos experimentais de diabetes indicam a apoptose como o principal mecanismo celular da depleção de podócitos na progressão da nefropatia diabética (EID et al., 2009; SUSZTAK et al., 2006; SZABÓ et al., 2006), embora

exista controvérsia se a apoptose ocorre precocemente (SUSZTAK et al., 2006) ou tardiamente (MENINI et al., 2007) no curso da glomerulopatia diabética. A cascata apoptótica no DM parece ser especificamente induzida pela hiperglicemia. Alta glicose e angiotensina II (ANG II) induzem apoptose em cultura de podócitos, mediada pela ação de TGF- β (DING et al., 2002; SCHIFFER et al., 2001). Há evidências que a formação de AGEs, de espécies reativas de oxigênio e ativação de NF-kB contribuem para apoptose de podócitos *in vitro* e *in vivo* (MENINI et al., 2007; PESCE et al., 2002; STEFFES et al., 1989; SUSTAK et al., 2006; SZABÓ et al., 2006). Além disso, outro mecanismo pode ser responsável pela perda podócitos no DM, e este refere-se ao destacamento dos podócitos da membrana basal glomerular (PETERMAN et al., 2003).

Em relação as formas de tratamento, a literatura relata que não existe uma estratégia terapêutica específica que possa ser recomendada para a nefropatia diabética, sendo possível apenas controlar parcialmente os fatores associados à gênese e à progressão da glomerulopatia diabética (LAGRANHA, 2007).

2.4 Estresse oxidativo e diabetes mellitus

Embora os dois principais tipos de diabetes (DMT1 e DMT2) tenham diferentes etiologias, ambos apresentam em comum a ocorrência de hiperglicemia (NDISANG; JADHAN, 2009), e diversos estudos sugerem que esse seja o principal fator responsável pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias das células alvo do DM (COOPER, 2008; FORBES; COUGHLAN; PATEL et al., 2013; REIS et al., 2008).

Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas altamente instáveis e reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e tendem a ligar esse elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; REIS et al., 2008). Como a maioria dos radicais livres é derivada do metabolismo do oxigênio, usa-se o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” ou do inglês, *Reactive Species Oxygens* (ROS) para denominá-los (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997). Apesar dos radicais livres serem resultado do próprio metabolismo celular, estes e outras espécies reativas contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas como Alzheimer, câncer, aterosclerose, doenças neurodegenerativas e diabetes, pela ativação do estresse oxidativo e danos oxidativos teciduais (BAYNES; THORPE, 1999; BUTTERFIELD, 2002; CHOWIENCZYK, et al., 2000; HALLIWELL, 2001).

O estresse oxidativo é definido como um estado de desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante endógena (MCCORD, 1994). Esse desequilíbrio pode causar danos em moléculas como lipídeos, DNA, proteínas, carboidratos, dentre outras (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Além disso, pode resultar em alteração no ciclo celular, inativação de proteínas e apoptose (EVANS et al., 2004). Dentre as ROS estão o superóxido (O_2^-), a hidroxiperoxila (HO_2^-), hidroxila (OH^-) e o não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo que todos podem causar danos a lipídios e proteínas (GIUGLIANO et al., 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

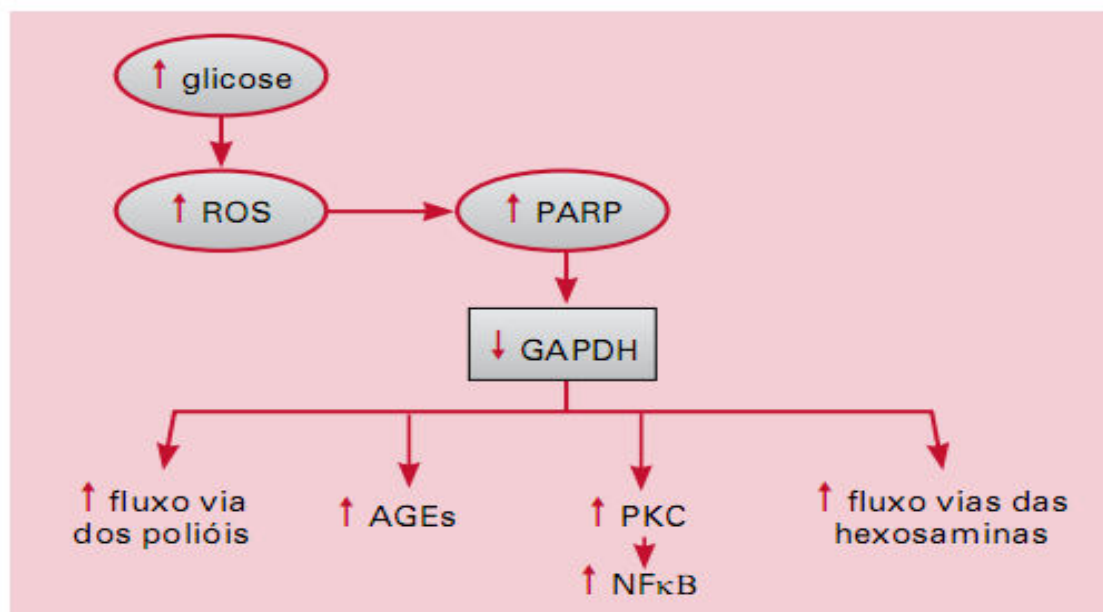
Os sistemas biológicos estão normalmente aptos a se defender contra o dano causado pelas ROS, regulando seu estado redox (redução/oxidação) através da utilização de diversos sistemas antioxidantes. As células se protegem contra o dano oxidativo por meio de processos de reparo, compartimentalização da produção de radicais livres e enzimas de defesa, como a superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathionas peroxidase (GSH-Px) e redutase (GSH-Rd). Assim como também podem utilizar antioxidantes exógenos, advindos da alimentação, onde estão inclusos a vitamina E, a vitamina C e os flavanóides (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

Esses sistemas de defesas antioxidantes são responsáveis tanto por removerem quanto por inibirem a formação das ROS, porém não são 100% efetivos (HALLIWELL, 1994). Pesquisas mostram que elevações agudas nos níveis de glicose podem deprimir as defesas antioxidantes naturais, o que pode levar a redução da proteção contra os efeitos deletérios das ROS (BAJAJ; KHAN, 2013; GIUGLIANO et al., 1996).

Segundo Brownlee (2005), nos mecanismos fisiopatológicos do diabetes, quatro principais vias são desencadeadas pelo aumento da glicose

intracelular e a partir daí são responsáveis pela gênese das complicações crônicas da doença: 1) aumento do fluxo pela via dos polióis, gerando estresse oxidativo; 2) aumento dos produtos avançados da glicação não enzimática (AGEs), gerando aumento de glicação de proteínas plasmáticas e da matriz extracelular; 3) ativação da via da PKC, gerando aumento de citocinas, estresse oxidativo e fatores proliferativos, e 4) aumento do fluxo pela via das hexosaminas, gerando aumento de citocinas. Baseando-se no fato de que pacientes tratados com drogas que bloqueiam um desses mecanismos não terem como resultado a prevenção completa das complicações crônicas, assim como parece não haver relação aparente entre os 4 mecanismos citados, o autor propôs então, um mecanismo unificador. Sendo assim, este está representado pelo aumento de estresse oxidativo na mitocôndria induzido pelo aumento da glicose intracelular, o qual leva à quebra das fitas do DNA nuclear, que ativa a poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). Esta modifica a atividade de uma enzima chave da via glicolítica, a gliceraldeído-3-fosfato (GADPH), reduzindo sua atividade, o que ativa a via dos polióis, aumenta a formação de AGEs, ativa a PKC e aumenta o fluxo pela via das hexosaminas (Figura 1).

Figura 1. Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia



Fonte: Reis, J. S. et al. (2008).

Vários são os estudos relacionando o estado diabetogênico e os marcadores de estresse oxidativo. Porém, no que diz respeito a como atuam os principais sistemas antioxidantes nessas condições, como a SOD, CAT e as glutatonas os dados são controversos.

2.5 Hipertensão arterial e diabetes mellitus

A alta morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos são predominantemente determinadas pelas disfunções vasculares. A microangiopatia diabética não se manifesta apenas como nefropatia, retinopatia e diminuição na cicatrização de feridas, mas também predispõe o paciente a desenvolver doenças coronarianas e cerebrovascular (CALLES-ESCADON; CIPOLLA; 2001; CREAGER et al., 2003). A fisiopatologia da vasculopatia diabética envolve a disfunção do endotélio, que é causado pelo aumento da produção de ROS, como uma consequência da hiperglicemia (CINAR et al., 2001; PASKALOGLU et al., 2004; TESFARAMIAM; COHEN, 1992).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) acelera a lesão renal associada ao DM. Hipertensão arterial e DM são os dois maiores fatores de risco independentes para a doença renal crônica (DRC) (USRDS, 2007), sendo que esses dois fatores frequentemente coexistem e sua combinação acarreta um aumento na incidência e severidade das complicações renais (COOPER et al., 1988). A presença da HAS associada ao DM determina aumento da albuminúria e na espessura da membrana basal glomerular (COOPER et al., 2001). Clinicamente, a redução significativa na pressão arterial parece ser a mais importante e simples intervenção para retardar a progressão da nefropatia diabética tanto no DM tipo 1 quanto no tipo 2 (GIUNTI et al., 2006). Pacientes diabéticos com pressão correspondente a 130/80 mmHg raramente desenvolvem microalbuminúria e demonstram um declínio anual na taxa de filtração glomerular (TFG), semelhante ao observado na população normal. Porém, pacientes diabéticos com pressão entre 130/80 e 140/90 mmHg

apresentam declínio mais acentuado no TFG, sendo que 30% dos pacientes desenvolvem microalbuminúria e proteinúria (GIUNTI et al., 2006).

Vários estudos demonstram alteração na vasodilatação endotélio-dependente nos animais diabéticos e muitos autores relatam o envolvimento do óxido nítrico (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). O óxido nítrico (NO) é constitutivamente gerado a partir das células endoteliais e contribui para a regulação das funções cardiovasculares. O NO formado através de NO-sintase endotelial (eNOS) induz a vasodilatação, baixo aumento na pressão sanguínea, inibição da agregação e adesão de plaquetas, diminuição da proliferação do músculo liso, e ainda apresenta efeitos benéficos como agente antiaterosclerótico. (TODA; IMAMURA; OKAMURA, 2010).

A disfunção endotelial observada em animais diabéticos pode ser decorrente de menor síntese e liberação de óxido nítrico, menor resposta da musculatura lisa aos fatores de relaxamento ou maior produção de fatores vasoconstritores, ou inativação do óxido nítrico por radicais livres. A participação de ROS na disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia tem sua base teórica na demonstração de que sistemas antioxidantes estão menos ativos no diabetes. Assim, a vasculatura dos pacientes com diabetes seria alvo para o ataque dos radicais livres, seja por meio de redução do estado antioxidante celular ou de maior suscetibilidade a auto-oxidação da glicose e oxidação do LDL – colesterol (SELIGMAN; CLAUSELL, 1999; TODA; IMAMURA; OKAMURA, 2010).

A melhora da vasodilatação endotélio-dependente tem sido relacionada, por muitos autores, à ação de antioxidantes endógenos ou exógenos. Com o uso de antioxidante exógeno, tem sido relatado que o uso de vitamina C, em indivíduos com diabetes tipo 1 e 2, foi associado a melhoria na vasodilatação endotélio-dependente (SELIGMAN; CLAUSELL, 1999). Quanto à proteção endógena, temos a melatonina, também amplamente utilizada de maneira exógena, é responsável por apresentar efeitos benéficos nas complicações vasculares do diabetes (REYES-TOSO et al., 2002; SUDNIKOVICH et al., 2007).

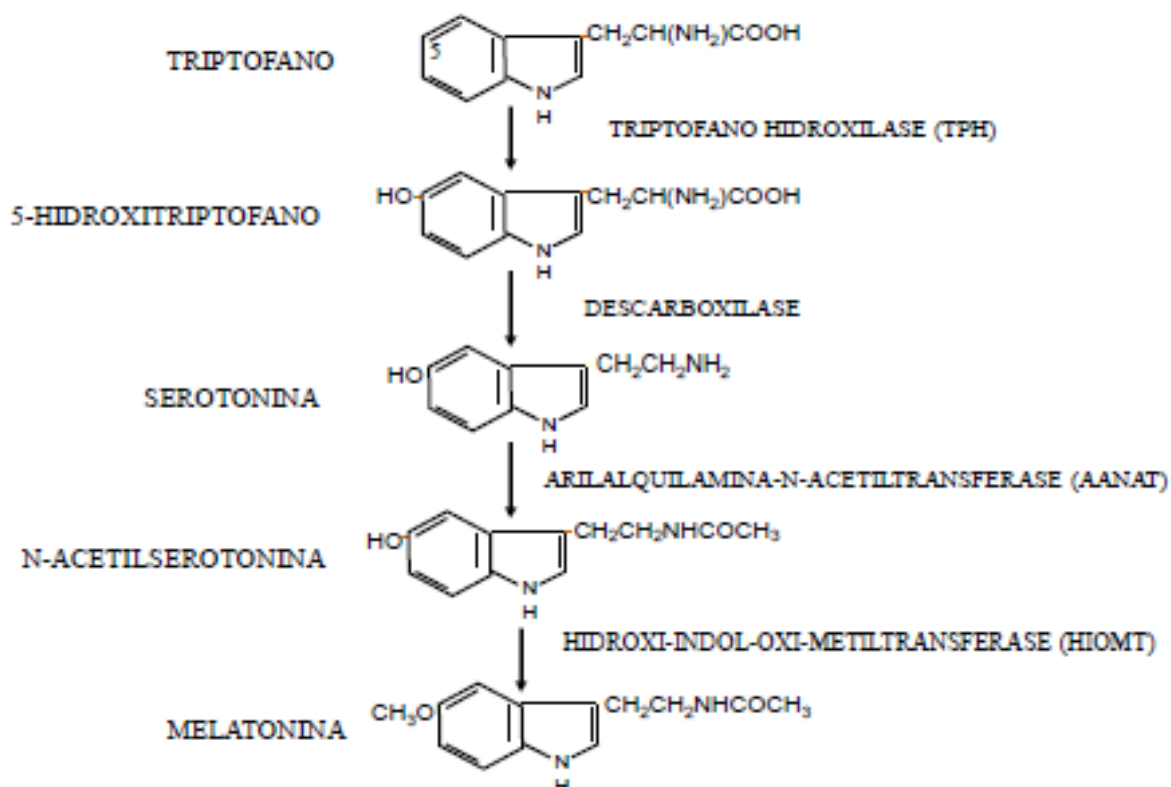
2.6 Melatonina e diabetes mellitus

É bem postulado que o estresse oxidativo implica na patogênese e progressão de muitas desordens degenerativas, incluindo a diabetes que ocorre naturalmente e quimicamente induzida (KAKKAR et al., 1995; WOLF et al., 1999; YAVUZ et al., 2003). Além do aumento na produção de radicais livres, os sistemas de defesa antioxidantes são afetados no DM (CUNNINGHAM et al., 1991; KURCER et al., 2007). Como resultado, o estresse oxidativo pode causar danos nas membranas celulares e dano na estrutura e integridade funcional de organelas, assim como pode ser um mecanismo potencial de várias complicações diabéticas (WEST, 2000; YAVUZ et al., 2003).

Vários antioxidantes são descritos por apresentarem efeitos benéficos no estresse oxidativo associado a doenças (JANG et al., 2000). Nos últimos anos, tem sido mostrado que a melatonina é um potente neutralizador de radicais hidroxilas e peroxilas, assim como regula a atividade de sistemas antioxidantes (REITER, 2000; TAN et al., 1993). A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado, principalmente, pela glândula pineal. Nesta glândula, existem células especializadas, os pinealócitos, que são responsáveis pela síntese da melatonina, a partir do aminoácido triptofano (MAGAHIN et al. 2008; TAMURA, 2008). A via biossintética ocorre a partir da hidroxilação do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), formando 5-hidroxitriptofano (5-HTP) (PEKELMAN et al., 2003). Em seguida, a enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) retira o grupo alfa-carboxil terminal do 5-HTP transformando-o em serotonina. Ocorre, então, uma reação catalisadora pela enzima N-acetiltransferase (NAT) que faz a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). A partir daí, a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em melatonina (CLAUSTRAT, 2005; DUBOCOVICH, 2003; MACCHI, 2004; REITER et al., 2009). Assim, como a produção de HIOMT, ocorre no período de ausência de luz, o mesmo é válido para a melatonina (PEKELMAN et al., 2003). Uma vez sintetizada na

glândula pineal, a melatonina é rapidamente liberada na corrente sanguínea (TAKE, 2009; VIJAYALAXMI, 2004) (Figura 2).

Figura 2. Via metabólica da síntese de melatonina



Fonte: Cipolla-Neto; Afache, (2008).

Existem três principais vias de degradação deste hormônio (rins, fígado e cérebro), sendo a hepática considerada a via clássica, onde a enzima CYP P450 do fígado metaboliza a melatonina em 6- hidroximelatonina, que em seguida é conjugada com um sulfato ou glucoronida, sendo então secretada na urina (MACCHI et al., 2005; SLOMINSKI et al., 2012).

Estudos demonstraram que a principal fonte de produção da melatonina é a glândula pineal (REITER, 1991). Porém, foi observado em mamíferos, que também ocorre síntese desse neurohormônio em outras partes do corpo e em menores concentrações, como: retina (MARKUS et al., 2003), pâncreas (BUBENIK, 2002; 2008), testículos (TIJMES; PEDRAZA; VALLADARES, 1996),

ovários (ITOH et al.,1999), trato gastrointestinal (HUETHER et al.,1992), pele (SLOMINSKI et al., 2005) , células do sistema imune (CARRILO-VICO et al., 2004) e outros locais com menor síntese. Essas outras fontes têm contribuição mínima para a concentração plasmática da melatonina, porém, são importantes para ação local na qual foram produzidas (MAGANHIN et al., 2008).

A melatonina apresenta diferentes funções fisiológicas, atuando em respostas imunomoduladoras, oncostáticas, anti-envelhecimento anti-apoptótica, anti-inflamatória e sobre o controle endócrino/reprodutivo, atuando nas gônadas, tireóide e adrenais (DEVOTO et al., 2002; FUJIMOTO et al., 2002; GRAHAM et al., 2004; HISSA et al., 2008). Além disso, é bastante ressaltada a sua capacidade antioxidante, o que a faz ser considerada um dos maiores antioxidantes naturais, evitando dano oxidativo em macromoléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (BAYDAS et al., 2004; LI et al., 2013; REITER et al., 1999; REITER et al., 2001).

A melatonina exerce seus efeitos biológicos por interação com receptores de membrana e intracelulares. São conhecidos três subtipos de receptores de membrana para melatonina, MT1, MT2 e MT3 (DUBOCOVICH, 1999). A interação da melatonina com esses receptores de membrana desencadeia vias de sinalizações diferentes dependendo do tecido alvo. Por exemplo, em células β pancreáticas, a ligação com receptores MT1 leva à ativação da proteína G inibitória (G_i), resultando na redução da atividade da adenil-cicalse e queda da geração de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e diminui a secreção de insulina (PESCHKE et al., 2000). No entanto, a ligação com receptores MT2 inibe a via da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que também inibe a secreção de insulina (PESCHKE, 2008; STUMPF et al., 2008). Em contrapartida, através de uma terceira via de sinalização, que envolve proteína G_q , fosfolipase C e inositol trifosfato (IP3) e consequente mobilização dos estoques intracelulares de cálcio, leva a um aumento da liberação de insulina (BACH et al., 2005; PESCHKE; BACH; MUHLBAUER, 2006).

A avaliação das relações entre diabetes, metabolismo da glicose, e os efeitos da melatonina é um tema de grande interesse (DERLACZ et al., 2005). Foi sugerido que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica na prevenção das complicações vasculares causadas pelo

diabetes (BONJUGA et al., 2004). A proteção antioxidante da melatonina já foi demonstrada tanto *in vivo* como *in vitro* ao nível de membrana celular, mitocôndrias e núcleo (REITER, 2000). Além de suas ações como um eliminador de radicais livres, ela também estimula enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase a glutatona peroxidase e a glutatona redutase, o que promove ainda mais a sua capacidade de reduzir a toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes associados (REITER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004).

No campo da ação da melatonina no diabetes, dados variados são encontrados na literatura, onde relata-se que a melatonina reduziu a hiperglicemia e a hiperlipidemia em ratas diabéticas por STZ (MONTILLA et al., 1998; NISHIDA et al., 2002). Por outro lado, outros registros mostram que não houve diminuição da hiperglicemia em ratos induzidos por STZ e posteriormente tratados intraperitonealmente com melatonina (VURAL et al., 2001). Entretanto, animais diabéticos por STZ pré-tratados com melatonina demonstraram níveis hiperglicêmicos mais baixos do que os mesmos animais não tratados (ABDEL-WAHAB; ADB-ALLAH, 2000), e que o tratameto com a mesma indolamina poderia restaurar o status antioxidante prejudicado em ratos diabéticos induzidos por STZ (ANWAR; MEKI, 2003).

Com base no exposto, a condição de hiperglicemia pode ativar diversas vias, que resultam em estresse oxidativo e levam lesões diretas nos rins. Diante da problemática e controvérsia acerca dos possíveis efeitos da administração da melatonina em animais induzidos ao diabetes faz-se necessário maiores investigações para elucidar os possíveis mecanismos e relações existentes entre a melatonina e o diabetes, em especial os efeitos dessa interação sobre os rins.

REFERÊNCIAS

- AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n.2 p. 60-64, 2007.
- ALSAAD K.O.; HERZENBERG, A.M. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update. **Journal of Clinical Pathology**. v. 60, p.18–26, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2011. **Diabetes Care**, v. 34, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 31, n. 1, p. 55-60, 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2014. **Diabetes Care**, v. 37, n.1, p.14-80, 2014.

ANWAR, M.M.; MEKI, A.M. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.135, p. 539-547, 2003.

ARAUJO, L.M. B.; BRITTO, M.M.S.; PORTO DA CRUZ, T.R. Tratamento do diabetes mellitus tipo 2: novas opções. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**, p.509-517, 2000.

BACH, A.G. et al. Melatonin stimulates inositol -1,4,5- trisphosphate and Ca^{2+} release from INS1 insulinoma cells. **Journal of Pineal Research**, v.39, n.3, p. 316-323, 2005.

BAJAJ, S.; KHAN, A. Antioxidants and diabetes. *Indian Journal Endocrinology and Metabolism*, v. 16, n. 8, p. 267-271, 2013.

BALAKUMAR, P. et al. Recent advances in pharmacotherapy for diabetic nephropathy: Current perspectives and future directions. **Pharmacological Research**, v. 60, p. 24-32, 2009.

BARISONI, L. et al. Advances in the biology and genetics of the podocytopathies: implications for diagnosis and therapy. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 133, p.201–216, 2009.

BAYDAS, G. et al. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. **Cell Biochemistry and Function**, v. 19, p. 37-41, 2001.

BAYNES, J.W.; THORPE, S.R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, v. 48, n.1, p. 1-9, 1999.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2000, p.260.

BELL, G.I.; POLONSKY, K.S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. **Nature**, v. 414, p. 788-91, 2001.

BERNE, R.B.; LEVY, M.N. **Tratado de Fisiologia Humana**. 4 Ed. RJ. Guanabara Koogan, 2000.

BALSELLS, M. et al. Glibenclamide, metformin and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **The British Medical Journal**, p.1-12, 2015.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. et al. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. **Diabetes & Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 163–176, 2000.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, p.1615-1625, 2005.

- BUBENIK, G.A. Gastrointestinal melatonina: localization, function and clinical relevance. **Diagnostic of Disease Science**, v.47, n.10, 2002.
- BUBENIK, G.A. Thirty four years since discovery of gastrointestinal melatonin. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.59, n.2, p. 933-951, 2008.
- BUCHANAN, T. A. et al. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p.105-111, 2007.
- BUTTERFIELD D.A., et al. Vitamin E and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress. **Nutritional Neuroscience**, v.5, p. 229–39, 2002.
- CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CALLES-ESCANDON, J.; CIPOLLA, M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective. **Endocrinology Reviews**, v.22, p.36–52, 2001.
- CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance; possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **The Federation of American Societies for Experimental Biology**. v.18, n.3, p. 537-539, 2004.
- CERIELLO, A; IHNAT, M.A.; THORPE, J.E. The “Metabolic Memory”: Is More Than Just Tight Glucose Control Necessary to Prevent Diabetic Complications? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, p. 410–415, 2009.
- CHOBANIAN, A.V. et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. **The Journal of the American Medical Association**, v. 289, n.19, p.2560-2572, 2003.
- CHOWIENCZYK, P. J. et al. Oral treatment with an antioxidant (roxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. **Diabetologia** v.43, p.97-977, 2000.
- CINAR, M. et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacology**, v.62, n.1, p.56-64, 2001.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula Pineal. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 980-990.
- COOPER, M.E.; JOHNSTON, C.I. Optimizing treatment of hypertension in patients with diabetes. **Journal of the American Medical Association**, v.283, n.24, p. 3177–3179, 2000.
- COOPER, M.E. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v.44, p.1957-1971, 2001.

- CORIGLIANO, G. et al. Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. **Acta Biomedica**, v. 77, p. 26-33, 2006.
- CREAGER, M.A., et al. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. **Circulation**, v.108, p.1527–1532, 2003.
- CUNNINGHAM, J.J. et al. Reduced mononuclear leukocyte ascorbic acid content in adults with insulin-dependent diabetes mellitus consuming adequate dietary vitamin C. **Metabolism**, v.40, p.146–149, 1991.
- DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 7, n. 35, p. 843-849, 2002.
- DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2_7 million participants. **The lancet**, v. 378, p. 31-40, 2011.
- DAVE G.S.; KALIA, K. Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2 diabetic patients with and without nephropathy. **Cell and Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 68–78, 2007.
- DEVOTO, L. et al. Control of human luteal estroidogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. V.86, p137-141, 2002.
- DIAS, E.P; SOARES, M.M.; RESENDE, L.M.H. **Diabetes Mellitus: Diagnóstico e Classificação**. Enciclopédia da Saúde: Diabetes Mellitus. Rio de Janeiro: Médsi, v.1. N.3, p. 341-348, 2001.
- DING ,G. et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. **American Journal of Physiology Renal**, v.283, p.173–F18, 2002.
- DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; BENLOUCIF, S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 460, p. 181-190, 1999.
- DUBOCOVICH, M. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontier in Bioscience**. v. 8, p.; 1093–1108, 2003.
- EATON, D. C.; POOLER, J. P. **Fisiologia Renal de Vander**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- EID, A.A. Et al Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. **Diabetes**, v.58, n.5, p.1201–1211, 2009.
- ELIAS, J.A.Z. et al. Efeito do Ramipril e da Sinvastatina sobre o estresse oxidativo de ratos diabéticos. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 52, n. 7, p. 1131-1138, 2008.
- EVANS, J. L. et al. Are Oxidative StressActivated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and-Cell Dysfunction? **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 1-8, 2004.

FARALDO, A.C. et al. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 13, p.240-246, 2005.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v43, n.1, p.61-68, 1997.

FERRINI, M.G. et al. Increased vaginal oxidative stress, apoptosis, and inducible nitric oxide synthase in a diabetic rat model: implications for vaginal fibrosis, **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, p. 1152–1163, 2006.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

FORBES J.M.; COUGHLAN, M.T.; COOPER, M.E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n.6, p. 1446-1454, 2008.

FOX, C.S. et al., Trends in cardiovascular complications of diabetes. **JAMA International Medicine**, v. 292, n. 20, p. 2495– 2499, 2004.

FUJIMOTO, A. et al. Human chorionic gonadotrophin combined with progesterone for luteal suport improves pregnancy rate in pacientes with low late midluteal stradio levels in IVF cycles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. V.19, p.550- 554, 2002.

GERSTEIN, H.C. et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. **The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n.4, p. 421-426, 2001.

GIUGLIANO, D. et al. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v.19, n.3, p.257-267, 1996.

GIUNTI, S. et al. Mechanisms of diabetic nephropathy role of hypertension. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 48, n.8, 2006.

GOULD, G.W.; HOLMAN, G.D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. **Biochemical Journal**, v.295, p.329-41, 1993.

GRAHAM, L.H. et al. Influence of oral melatonin on natural and gonadotrophin-induced ovarian fuction in domstc cat. **Therigenology**. V. 61, p. 1061- 1076, 2004.

GREEN, L.C. et al. Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 78, p. 7764-7768, 1981.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, n. 1, p. 16 – 26, 2002.

GROSS, J.L. et. al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v.28, n.1, Jan., 2005.

GURPINAR, T. et al. The effects of the melatonin treatment on the oxidative stress. **The Scientific World Journal**, v. 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361279>> Acesso em: 18 de agosto de 2014.

HAKIM, F.A.; PFLUEGER, A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease. **Medical Science Monitor**, v. 16, p. 37-48, 2010.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs and Aging**, v. 18, p. 685–716, 2001.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p. 231–255, 2004.

HARALDSSON, B. et al. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. **Physiological Reviews**, v.88, p.451–487, 2008.

HARTMANN, B; CZOCK, D.; KELLER, F. Drug therapy in patients with chronic renal failure. **Deutsches Arztleblatt International**, v. 107, p. 647-655, 2010.

HENRY, D.N. et al. Glucose transporters control gene expression of aldose reductase, PKC α , and GLUT1 in mesangial cells in vitro. **American Journal of Physiology**, v. 277, n.1, p.97-104, 1999.

HIRIART, B. M. et al. Hormona de la oscuridad. **Revista latinoamericana de patologia clinica**. v. 59, n. 4, p. 222-232 , 2012.

HISSA, M.N. et al. Melatonina e a glândula pineal. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v. 2, n. 4 p. 1-10, 2008.

HUETHER et al. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in check iin rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis in the gastrointestinal tract. **Life Science**, v.52, p. 945-953, 1992.

ITOH, M. T. et al. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. **Molecular Human Reproduction**. v. 5, n.5, p.: 402–408, 1999.

JAHN, M.C. **Efeitos da Dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre o metabolism muscular e a função renal em ratos diabéticos**. 2010. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

JANG, Y.Y. et al. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 42, p. 361-371, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.;CARNEIRO, J.L. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2013, p. 103, p. 413, p. 413-416.

KILIC, E. et al. Prophylactic use of melatonin protects against focal cerebral ischemia in mice: role of endothelin converting enzyme-1. **Journal of Pineal Research**, v. 37, n. 4, p. 247–251, 2004.

- KING, H.; AUBERT, R.E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, p. 1414-1431, 1998.
- KING, H.; REWERS, M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. **Diabetes Care**, v. 16, p. 157-177, 1993.
- KRIZ, W.; LEHIR, M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. **Kidney International**, v. 67, n.2, p. 404-419, 2005.
- KURCER, Z. et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 115, n. 6, p. 365-371, 2007.
- LAGRANHA, C.J. et al. Bases glomerulares da nefropatia diabética. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 51, n. 6, p. 901-912, 2007.
- LI, D et al. Melatonin receptor genes in vertebrates. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 11208–11223, 2013.
- LI, JJ. et al. Podocyte biology in diabetic nephropathy. **Kidney International** v.106, p.36-42, 2007.
- LI, X. et al. Electroretinographic oscillatory potentials in diabetic retinopathy. **Documenta Ophthalmologica**, v. 81, p. 173-179, 1992.
- MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.25, n.4, p. 177–195, 2004.
- MAGANHIN, C. C. et al. Melatonin effects on the female genital system: a brief review. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v.54, n.3, p. 267-271, 2008.
- MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**, v. 15, p. 1509-1516, 1992.
- MARKUS, R.P. et al. Glândula pineal e Melatonina. In: L.S.Menna- Barreto; N.Marques. (Org.). **Cronobiologia: Princípios e Aplicações**. 3a ed. São Paulo: EDUSP, v. 35, p. 191- 222, 2003.
- MARSHALL, S.M. The podocyte: a potential therapeutic target in diabetic nephropathy? **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.26, p. 2713–2720, 2007.
- MAUER, S.M. Structural-functional correlation of diabetic nephropathy. **Kidney International**, v. 45, p. 612-622, 1994.
- MCCANN, S.M. et al. The nitric oxide theory of aging revisited. **Annals of the New York Academic of Sciences**, v. 1057, p. 64–84, 2005.

MEHMET, G. et al. Protective Effects of Melatonin and Aminoguanidine on the Cornea in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. **Cornea**, v. 27, n. 7, p. 795-801, 2008.

MENINI, S. et al. Ablation of the gene encoding p66Shc protects mice against AGE-induced glomerulopathy by preventing oxidant-dependent tissue injury and further AGE accumulation. **Diabetologia**, v. 50, p. 1997-2007, 2007

MOLITCH, M.E. et al. Nephropathy in diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p.79-83, 2003.

MONTILLA et al. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 25, n.2, p. 94-100, 1998.

NDISANG, J.F.; JADHAN, A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v.296, p.829-841, 2009.

NIRANJAN, T. et al. The Notch pathway in podocytes plays a role in the development of glomerular disease. **Nature Medicine**, v.14, p.290–298, 2008.

NISHIDA, S. Metabolic effects of melatonin on oxidative stress and diabetes mellitus. **Endocrine**, v. 27, p. 131–136, 2005.

OLIVEIRA, A.F. et al. Global burden of disease attributable to diabetes mellitus in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p.1234-44, 2009.

ONENGUT-GUMUSCU, S. et al. Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. **Immunological Reviews**, v. 190, p.182-194, 2002.

ONKAMO, P. et al. Worldwide incidence of type I diabetes – the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia**, v. 42, p. 1395-03, 1999.

OZGUNER, F.; BARDAK, Y.; COMLEKCI, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 282, p. 83–88, 2006.

PADILLO, F.J.; CRUZ, A.; NAVARRETE, C. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. **Free Radical Research**, v. 38, n. 7, p. 697–704, 2004.

PASKALOGHU, K.; SENER, G.; AYANGOLU-DULGER, G. Melatonin treatment protects against diabetes induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 345-354, 2004.

PATEL, H et al. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. **Cardiovascular Diabetology**, v.12, p.142 – 155, 2013.

PEI, Z.; PANG, S.F.; CHEUNG, R.T.F. Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. **Stroke**, v. 34, n. 3, p. 770–775, 2003.

- PEKELMANN, R. M. et al.. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstein**, v. 1, p. 143-148, 2003.
- PESCHKE, C. et al. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. **Nephron.**, v.90, p. 484-488, 2002.
- PESCHKE, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. **Journal of Pineal Research**, v. 44, p. 26-40, 2008.
- PESCHKE, E. et al. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonatal rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. **Journal of Pineal Research**, v. 28, n. 3, p. 156- 164, 2000.
- PINHEIRO, L.S. et al. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v.38, n.2, 2011.
- RAO, V.S.N. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 3, p. 127–130, 2002.
- REDDY, G.R. et al. The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 17, n.1, p. 32-36, 2008.
- REIS, J.S. et al. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.
- REITER, R. J. et al. The oxidant/antioxidant network role of melatonin. **Biological Signals and Receptors**, v. 8, p.56-63, 1999.
- REITER, R. J. et al. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 939, p. 200-215, 2001.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; BURKHARDT, S. reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. **Mechanisms of Ageing and development**, v. 123, n. 8, p. 1007-1019, 2002.
- REITER, R. J. et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **Journal of Biomedical Research**, v. 7, p. 444–458, 2000.
- REITER, R. J. et al. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Annals of the New York Academic of Sciences**, v. 939, p. 200-215, 2001.
- REMUZZI, G.; MACIA, M.; RUGGENENTI, P. Prevention and treatment of diabetic renal disease in type 2 diabetes: The benedict study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, p. 90-97, 2006.
- RENNO, W.M. et al. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. **Jornal Brasileiro de Nutrição**, v. 100, n.3, p.652-659, 2008.
- RESNIKOFF, S. et al. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bulletin of World Health Organization**, v. 82, p. 844-845, 2004.

ROCCO, M.V. et al. Elevated glucose stimulates TGF- β gene expression and bioactivity in proximal tubule. **Kidney International**.v. 41, p.107-114, 1992.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia, texto e atlas em correlação com biologia celular e molécula**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 908p.

SÁENZ, D.A. et al., Physiological concentrations of melatonin inhibit the nitridergic pathway in the Syrian hamster retina, **Journal of Pineal Research**., v. 33, n. 1, p. 31–36, 2002.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v.414, p. 799-806, 2002.

SELIGMAN, B.G.S.; CLAUSELL, B. Disfunção endotelial no diabetes melito. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 3, p. 288-295, 1999.

SCHIFFER M, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- β and Smad7. **The Journal of Clinical Investigation**. , v. 108. p.807–816, 2001.

SCHMEICHEL, A.M. et al. The nitric oxide theory of aging revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1057, p.64–84, 2005.

SCHMEICHEL, A.M.; SCHMELZER, J.D.; LOW, P.A. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 52, n. 1, p. 165–171, 2003.

SHERWIN, R.S. **Diabetes mellitus**. In: Goldman L, Bennett J.C. Cecil textbook of medicine. 21 ed. Philadelphia: Saunders; p.1263-85, 2000.

SIMA, A.A; SUGIMOTO, K. Experimental diabetic neuropathy: an update. **Diabetologia**, v. 42, n.7, p. 773-788, 1999.

SLOMINSKI, R M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152-166, 2012.

SMITH, COLLEEN; MARKS, ALLAN D.; LIEBERMAN, MICHAEL. **Bioquímica médica básica de Marks**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 992 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009**. 3ed., Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

SPADELLA, C.T. et al. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 1, 2005.

STUMPF, I.; MUHLBAUER, E.; PESCHKE, E. Involvement of the cGMP pathway in mediating the insulin-inhibitory effect of melatonin in pancreatic beta-cells. **Journal of Pineal Research**, v.45, .3, p. 318-327, 2008.

SUSZTAK, K.; RAFF, A.C.; SCHIFFER, M. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. **Diabetes**, v. 55, p. 225-33, 2006.

- SZABÓ C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice. **Diabetes**, v.55, p.3004–3012, 2006.
- SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. **Physiology Research**, v. 50, n. 6, p. 537-546, 2001.
- TAKE, G. et al., Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 621-628, 2009.
- TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v. 44, p.: 280-287, 2008.
- TAN D.X. et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology Journal**, v.1, p.57-60, 1993.
- TEIXEIRA, A.A.C. et al. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. **International Journal of Morphology**, v. 22, n. 3, p. 189-194, 2004.
- TESFAMARIAM, B.; COHEN, R.A. Free radical is mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v.263, p.321-326, 1992.
- TIJMES, M; PEDRAZA, R; VALLADARES, L. Melatonin in the rat testis: Evidence for local synthesis. **Steroids** v. 61, p. 65-68, 1996.
- TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. *Pharmacol Ther.* 2010;127:189–209.
- UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. U S Renal Data **System annual report**. Bethesda: National Institutes of Health and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.
- VANDER JAGT, D.J. et al. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. **Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 265-270, 2001.
- VIJAYALAXMI, R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.59, n.3, p. 639–653, 2004.
- VILAÇA-JUNIOR, P.E.A. et al. Efeito da administração pré-natal da dexametasona em ratas sobre os perfis glicídicos e hematológicos materno e da prole. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.3, p.606-614, 2012.
- VURAL, et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. **Journal of Pineal Research**, v.31, p.193–198, 2001.
- WAJCHENBERG, B.L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Ed. Roca, 1992.

- WEST, I. C.: Radicals and oxidative stress in diabetes. **Diabetic Medicine**. v. 17, p. 171–180, 2000.
- WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes - estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**., v. 27, n. 5, p. 1047–53, 2004.
- WOLF, G.; ZIYADEH, F.N. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. **Neprhon physiology** , v.106, n.2, p. 26-31, 2007.
- WOLF, G.; ZIYADEH, F.N. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy. **Kidney International**, v. 56, p. 393-405. 1999.
- YAMAZAKI, R. K. **Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de vanádio peroxidados identificação de proteínas intracelulares envolvidas no mecanismo de ação em músculo sóleo**. 2004. 51 f. Dissertação (mestrado em biologia celular e molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- YAVUZ, O. et al. Protective effect of melatonin on cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Acta histochemica**, v.105, n.3, p. 261–266, 2003.
- ZHOU, G. et al. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. American **Journal of Pathology**. v.165, p.2033–2043, 2004.
- ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and social implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.
- ZINTZARA, E.; PAPATHANASIOU, A.A.; STEFANIDIS, I. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and diabetic nephropathy: A HuGE and meta-analysis. **Genetics in Medicine**, v. 11, n.10, p.695-706, 2009.
- ZIYADEH, F.N.; WOLF, G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. **Current Diabetes Reviews**, v. 4, n.1, p.39-45, 2008.

CAPÍTULO II

Avaliação da melatonina exógena sobre os efeitos adversos da nefropatia diabética experimental

Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Ismaela Maria Ferreira de Melo¹, Simone Gutnan Vaz¹,
Leucio Duarte Vieira Filho², Franklin Magliano da Cunha Magliano¹, Valdemiro
Amaro da Silva Júnior¹, Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho
Teixeira^{1*}

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, Recife, Brasil

² Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois
Irmãos-Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389
E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br (TEIXEIRA, A.,A.,C.)

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar se a administração da melatonina pode amenizar os efeitos adversos da nefropatia diabética, melhorando diretamente características como função renal, pressão arterial e o estresse oxidativo. Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), divididos em 5 grupos: **GC**: ratos sem indução ao diabetes; **GD**: ratos induzidos ao diabetes e administrados com placebo; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes e administrados com melatonina; **GDMS**:

ratos induzidos ao diabetes e administrados simultâneamente com melatonina; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes e administrados com insulina. O diabetes experimental foi induzido por estreptozotocina. Os resultados mostraram que a administração da melatonina no grupo GDMS foi capaz de produzir efeitos benéficos nas alterações encontradas nos animais do GD, atuando de maneira positiva ao reduzir o peso dos rins e o índice organossomático, tendência a redução dos valores hiperglicêmicos, proteção das células beta pancreáticas refletidos nos valores de insulina, recuperação dos níveis plasmáticos do óxido nítrico, bem como minimizou as alterações histológicas, reduzindo também o acúmulo de glicogênio e colágeno nos rins desses animais. Além disso, os valores de creatinina e uréia apresentaram-se equivalentes ao do GC. Melatonina também reduziu as níveis de TBARS e a taxa de células apoptóticas. No entanto, não interferiu significativamente sobre a atividade da GSH, ganho de peso corporal e pressão arterial nos grupos estudados. Assim, concluímos que a administração da melatonina atuou de maneira benéfica sobre a histofisiologia renal de animais com o quadro de nefropatia diabética, comprovando sua capacidade antioxidante e protetora sobre os rins.

Palavras-chave: diabetes, estresse oxidativo, apoptose, melatonina, rins, ratos

1. INTRODUÇÃO

A nefropatia diabética (ND) constitui uma das complicações microvasculares mais graves do diabetes mellitus (DM)¹. Sendo considerada a principal causa de indicação para diálise e transplante (estágio terminal da doença) e da insuficiência renal crônica (IRC), afeta cerca de 30% dos portadores de diabetes^{2,3}. Histologicamente, os efeitos do

DM nos rins incluem a esclerose do glomérulo, aumento de matriz extracelular e membrana basal, além de proliferação mesangial ^{4,5}.

Uma das principais causas das complicações diabéticas é o estresse oxidativo, que tem sido apontado como um estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante endógena⁶. Muitas das alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia produzem estresse oxidativo devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), gerados principalmente durante a auto-oxidação da glicose e em diferentes reações oxidativas que acompanham a glicação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a danos diretos no DNA, membrana e a morte celular ^{7,8}. Além disso, no diabetes, ocorre também redução da ação dos sistemas de defesa antioxidante pelo dano oxidativo das enzimas envolvidas⁷.

Visando minimizar tais injúrias teciduais causados pelas espécies reativas de oxigênio, diversos estudos têm utilizado a administração exógena de substâncias antioxidantes.^{9,10} A melatonina é uma indolamina produzida e secretada principalmente pela glândula pineal dos vertebrados no período noturno.^{11, 12} Esse hormônio apresenta diversas funções, estando envolvido no controle dos ritmos biológicos¹³ e na regulação da reprodução.¹⁴ Além disso, é amplamente aceito como um potente antioxidante, pois, estudos prévios demonstraram sua capacidade de neutralizar radicais livres, como, hidroxilas e peroxilas, além de regular a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase^{15, 16, 17}. Estas ações combinadas da melatonina, assim como a baixa toxicidade e sua habilidade de atravessar todas as membranas morfofisiológicas permite que promova sua ação antioxidante através de todo o organismo.¹⁸

Pesquisas têm demonstrado o efeito da melatonina frente ao diabetes^{19, 20} e esta parece ser capaz de reduzir a peroxidação lipídica no plasma²¹ e prevenir danos

causados pela diabetes experimental no pâncreas²², coração e corpo cavernoso²³. Contudo, seus efeitos a nível renal são pouco esclarecidos. Apesar de tantas evidências positivas no uso da melatonina diante as diversas alterações diabéticas, controvérsias ainda podem ser observadas sobre os seus efeitos na apoptose, controle glicêmico e pressão arterial, que estão intimamente associados com a progressão da doença renal^{24,20}.

Diante disso, o objetivo da pesquisa foi avaliar se a administração da melatonina exógena após ou simultaneamente a indução do diabetes em ratos pode neutralizar os efeitos da nefropatia diabética em ratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com 90 dias de idade, pesando em torno de 300 ± 30 g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00h. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos, cada um com 10 animais:

Os animais foram divididos, aleatoriamente, em cinco grupos com 10 animais. GC -Ratos sem indução ao diabetes (Controle); GD - Ratos induzidos ao diabetes e administrados com placebo; GDM - Ratos induzidos ao diabetes e administrados com melatonina após confirmação da hiperglicemia; GDMS - Ratos induzidos ao diabetes e administrados com melatonina a partir do dia de indução ao diabetes (simultâneo); GDI

- Ratos induzidos ao diabetes e administrados com insulina. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional da Universidade Federal Rural de Pernambuco, de nº. 23082.024895/2013-33.

Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas, em dosagem única. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente²⁵. Foram incluídos no estudo, para os grupos diabéticos, apenas os animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL ²⁶ (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), para início da administração da melatonina ou insulina.

Administração da melatonina

A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizada por meio de injeções intraperitoneais no início da noite (18:00) durante 20 dias ²⁶ na dosagem de 10mg/kg ²⁰. A melatonina foi dissolvida em etanol e diluída em salina na proporção de 1:9 ²⁷.

Administração da insulina

A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10h e 3 unidades restantes às 19h ²⁸.

Peso corporal e Índice Organossomático (IO)

Para o ganho de peso corporal os animais foram pesadas diariamente durante os período experimental utilizando balança analítica de precisão.

O índice organossomático foi utilizado como um indicativo da ação da diabetes nos rins desses animais, uma vez que os efeitos da enfermidade nesse órgão são previamente reportados. Após o experimento foi calculado a razão entre o peso dos rins pelo peso corpóreo de cada animal, para a obtenção de seus respectivos índices organossomáticos, como na figura abaixo:

2. Onde:

3. IO: Índice organossomático;

4. PO: Peso do órgão;

5. PC: peso corporal.

$$IO = \frac{PO}{PC} \times 100$$

Histopatologia e histoquímica dos rins

Após 20 dias de tratamento os animais foram anestesiados com hidrocloridrato de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, para remoção do rins. Os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia por meio do aprofundamento anestésico. Os rins coletados foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, permanecendo no mesmo por 24 horas. Posteriormente foram processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H. E.), para análise histopatológica. A avaliação histoquímica foi realizada através do PAS (Ácido Periódico de Schiff), para detecção de glicopolissacarídeos, bem como através do tricrômico de Gomori, para visualização das fibras colágenas no tecido renal.

Índice apoptótico (IA)

Foi utilizado o método TUNEL como indicador de apoptose. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS por 5 minutos à temperatura ambiente. Após, a Proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão de equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT (desoxinucleotídeo terminal transferase) a 37° por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation™) (± 20 minutos), sendo contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Após as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para serem montadas e observadas em microscópio de luz.

O índice apoptótico foi determinado pelo cálculo da percentagem de células positivas a partir de, pelo menos, 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40x^{29, 30}.

Glicose sanguínea

A glicemia de jejum dos animais foi monitorada durante o período experimental, sendo medida com o auxílio de um Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ, nos momentos antes da indução, confirmação do diabetes, 10 e 20 dias após administrações de melatonina ou insulina.

Dosagens de insulina e óxido nítrico

As amostras sanguíneas foram coletadas nos períodos antes da indução, 10 e 20 dias após os tratamentos. Para isso, os ratos foram imobilizados em contensor mecânico e o sangue coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G)³¹. Após centrifugação refrigerada, o plasma foi acondicionado em microtubo eppendorf, em duplicata, e congelado a -20°C até o momento das dosagens^{32, 33, 34}. A insulina plasmática foi determinada pelo método de ELISA utilizando "kit" comercial específico para rato (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

A dosagem de óxido nítrico (ON) no plasma foi determinada pela concentração de íons nitrito (NO^{-2}), utilizando o reagente de Griess³⁵. Para isto, 50µL de plasma por animal foi adicionado a 100µL de sulfanilamida (1%) em ácido fosfórico (5%), sendo utilizadas cinco repetições por tratamento. As concentrações de NO^{-2} foram obtidas após cinco minutos de incubação à temperatura ambiente da mistura de 50 µL de cada amostra (plasma/sulfanilamida) e 50µL de NEED (dicloridrato de naftiletilenodiamina) a 0,1%³⁶. Absorbância foi lida usando uma leitora de microplacas ELx800TM (Biotek Instruments Inc.) em 562nm utilizando o programa Gen5 ELISA (Biotek®). A curva padrão foi realizada com concentrações crescentes de nitrito de sódio 0.8-200mm. A quantidade de nitrito nas amostras foi então correlacionada com valores de absorbância obtidos a partir da curva padrão.

Marcadores de estresse oxidativo tecidual

A mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de Ohkawa et al. (1979). Fragmentos dos rins foram macerados em banho de gelo com 5ml de KCl 1, 15% + EDTA 3mM por grama de tecido. Em seguida, 10 mg de tecido foram adicionados a um meio de reação

contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,4%, ácido tricloroacético (TCA) 7,5% e ácido tiobarbitúrico 0,3%. Os tubos de reação foram selados e incubados a 95°C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de n-butanol para cada volume de reação e os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada em 535nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato. A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Folin³⁸, utilizando BSA como padrão.

Os níveis da glutathiona reduzida (GSH) foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfrídilas não protéicos.³⁹ A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, 80 a 160 mg do tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 4mM, EDTA 4mM e DTNB 4mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

Análise da função renal

A função renal foi avaliada por meio das determinações dos níveis plasmáticos de creatinina e uréia, utilizando para isso, *kits* reagentes da Labtest Diagnóstica S.A.®, conforme especificações do fabricante.

Avaliação da pressão arterial média

Para avaliação da pressão arterial média (PAM) através de método direto, no dia seguinte ao término das administrações, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) e alocados em mesa cirúrgica. A artéria femural foi

submetida a canulação e o cateter foi acoplado a um transdutor de pressão (ADInstruments, Colorado Springs, USA). As medidas de PAM foram obtidas após um período de estabilização de 10 minutos.

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, e as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

RESULTADOS

Ganho de peso dos animais

Em relação ao ganho de peso dos animais dos diferentes grupos experimentais, houve uma redução no ganho de massa corporal dos ratos induzidos ao diabetes (GD), independente da administração da melatonina (GDM e GDMS) quando comparados ao grupo controle (GC) e diabético insulina (GDI), onde evidenciou-se aumento significativo no ganho de peso corporal dos animais (Fig. 1).

Níveis de glicose sanguínea

Antes da indução do diabetes os animais de todos os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas nos níveis de glicose sanguínea, mostrando valores abaixo de 120 mg/dL. Após a indução, todos os animais, com exceção os do grupo controle (GC), apresentaram níveis sanguíneos de glicose acima de 300 mg/dL, diferindo significativamente deste grupo, confirmando assim o quadro de diabetes. Após 10 e 20 dias de administração com melatonina ou insulina evidenciou-se que o único grupo que apresentou níveis semelhantes ao grupo controle foi o administrado

com insulina (GDI). No entanto, no decorrer do período experimental, aos 10 e 20 dias de administrações, os animais do grupo GDMS apresentaram valores hiperglicêmicos menores, indicando diferença estatística em relação a glicemia dos animais diabéticos placebo e diabético melatonina (Tabela. 1).

Níveis plasmáticos de insulina

A dosagem dos níveis plasmáticos do hormônio insulina revelou que antes da indução ao diabetes pela estreptozotocina, todos os ratos apresentaram valores sem diferença estatística em relação ao grupo controle (Fig 2A). Entretanto, ao serem analisados após 10 e 20 dias das respectivas administrações de melatonina ou insulina, observou-se que apesar de um aumento significativo nos valores da insulina plasmática do grupo administrado com melatonina a partir do dia de indução ao diabetes (GDMS), apenas o grupo diabético tratado com insulina apresentou valores similares aos dos animais do grupo controle, restaurando assim, seus níveis hormonais. (Fig. 2B e 2C).

Níveis plasmáticos de óxido nítrico

As análises plasmáticas das concentrações de óxido nítrico (ON) revelaram que os animais dos grupos experimentais, antes do tratamento, não apresentaram diferença significativa em relação a este radical. Por outro lado, após a indução ao diabetes, decorridos 10 dias da administração com melatonina ou insulina, os valores apresentavam-se baixos, demonstrando apenas diferenças significativas em relação ao GDMS. Após o período experimental e respectivos tratamentos, os níveis de óxido nítrico continuaram reduzidos no grupo diabético, no entanto a administração de melatonina ou insulina restabeleceu estes valores para os níveis dos animais controle (Tabela. 2).

Índice organossomático (IO)

De acordo com a análise estatística, constatou-se que houve variação significativa no índice organossomático dos rins dos animais diabéticos em relação aos demais grupos, evidenciando dessa maneira, um aumento na proporção entre o peso dos rins e o peso corporal desses animais. No entanto, os respectivos tratamentos resultaram na redução do índice organossomático, não apresentando diferenças significativas entre os valores dos grupos administrados com a melatonina ou insulina e os animais do grupo controle (Fig. 3).

Função renal

A análise da função renal mostrou que, coincidentemente, as concentrações plasmáticas de creatinina e uréia apresentaram o mesmo comportamento ao longo do período experimental sem apresentar variações dos seus valores antes da indução entre os grupos experimentais (Figs. 4A e 5A). Porém, na metade do tratamento, aos 10 dias, observou-se aumento significativo das suas concentrações no grupo diabético (GD) e diabético tratado com melatonina após a confirmação da hiperglicemia (GDM) (Figs 4B e 5B). Por outro lado, quando analisados ao término das respectivas administrações, verificou-se que apenas o grupo diabético (GD) continuou com níveis aumentados de ambos marcadores (Figs. 4C e 5C), demonstrando assim, que tanto a melatonina como a insulina foram capazes de reduzir a creatinina e uréia plasmática a níveis semelhantes ao grupo controle.

Pressão arterial

A análise dos níveis pressóricos dos animais, realizada após os respectivos tratamentos, não apresentou diferenças significativas entre os grupos experimentais, apesar de um aparente aumento nos valores do grupo diabético (GD) (Fig. 6).

Análise histopatológica e histoquímica do tecido renal

A análise histopatológica dos rins do grupo controle mostrou que estes apresentam-se bem preservados, com glomérulos e os túbulos contorcidos proximais e distais com características normais (Fig. 7A). Entretanto, ao analisar os rins do GD e GDM, foram evidenciadas características patológicas semelhantes, com intensa atrofia no túbulo distal e alterações nas células epiteliais do túbulo contorcido proximal, onde observamos uma intensa presença de vacúolos irregulares, caracterizando a degeneração hidrópica das mesmas, bem como a presença de nefrose multifocal. O lúmen dos túbulos apresentou-se parcial a completamente obliterado, pela presença de albuminúria e debris celulares. Nos glomérulos destes animais foram evidenciados danos distintos, como atrofia e degeneração, caracterizadas pelo espaçamento da cápsula de Bowman e redução do tufo glomerular. Adicionalmente ocorreu um aumento do tamanho de alguns glomérulos com redução do espaço subcapsular e aparente aumento da membrana basal e dos componentes celulares, características que evidenciam um quadro de glomerulite membranoproliferativa (Fig 7B-C). A região medular dos animais do grupo diabético apresentou-se com intensa congestão dos vasos sanguíneos (Fig. 7D), enquanto no grupo GDM observa-se uma aparente redução da congestão vascular medular (Fig. 7 F).

Os rins dos animais administrados com melatonina a partir do dia de indução (GDMS) e dos animais administrados com insulina (GDI), apresentaram aparente redução nos danos observados nos demais grupos, o que sugere uma certa recuperação

desses animais, principalmente no último grupo, que demonstra alguns glomérulos com características normais (Figs. 8A e C). Da mesma forma, a congestão medular observada nos animais diabéticos foi evidentemente menor nos animais administrados com melatonina simultânea e insulina (Fig. 8B e D).

A análise histoquímica, em relação à presença de fibras colágenas, mostrou que o grupo controle apresentou forte marcação, entretanto, o grupo induzido ao diabetes e tratado apenas com placebo teve um aparente aumento na intensidade pelo corante tricrômico de Gomori nos túbulos e glomérulos, em relação aos demais grupos (Fig. 9B). Os grupos que receberam administração da melatonina antes ou após a confirmação do diabetes (GDMS e GDM, respectivamente), assim como o administrado com insulina, apresentaram aparente redução na marcação para colágeno quando comparado ao grupo diabético (Fig. 9C-E).

A histoquímica pelo PAS evidenciou a marcação da membrana basal dos glomérulos e túbulos contorcidos proximais e distais, assim como delimita a borda em escova do epitélio tubular. (Fig 10 A). Aparentemente, o grupo diabético mostrou uma marcação mais intensa na membrana basal e espessamento da mesma, nos glomérulo e túbulos. Além disso, foi observada a presença de albuminúria no lúmen tubular desses animais (Fig. 10B e C). A presença de glicopolissacarídeos nos animais administrados com melatonina (GDM e GDMS) e insulina (GDI) apresentou marcação semelhante ao controle, onde observamos redução na presença de albuminúria intratubular e na intensidade de reação ao PAS (Fig. 10D -F).

Apoptose e índice apoptótico (IA)

O ensaio pelo teste de TUNEL foi positivo nos rins de todos os grupos experimentais, entretanto foi mais significativo nos rins dos animais do grupo diabético, e GDM, os quais apresentaram os maiores valores do IA. Por outro lado, a administração da melatonina em período simultâneo com a indução do diabetes resultou no declínio da porcentagem de células Tunel-positivas característica também observada nos animais do GDI, evidenciando que a porcentagem de células em apoptose após 20 dias de administração da melatonina ou insulina foi significativamente menor do que as porcentagens do GD, demonstrando dessa forma, sua eficiência em evitar o dano oxidativo e a morte celular nos animais destes grupos (Figs 11 e 12).

Estresse oxidativo renal

A análise tecidual dos níveis de peroxidação lipídica através do TBARS, após o período de tratamento, revelou que os animais do grupo diabético apresentaram valores elevados deste marcador, diferindo significativamente em relação ao GC e GDM. Entretanto, analisando os valores dos grupos GDMS e GDI, observa-se que estes apresentaram a uma tendência a redução das concentrações, porém sem diferença estatística quando comparados ao GD. A redução dos níveis do TBARS foi observada apenas no GDM, pois os valores deste grupo retornaram aos valores do grupo controle (Fig. 13).

Em relação às concentrações teciduais do GSH, também avaliada ao final dos respectivos tratamentos, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Fig. 14).

DISCUSSÃO

Os trabalhos com modelos de diabetes experimental em ratos têm sido amplamente utilizados na reprodução da sintomatologia do DM, uma vez que esses animais apresentam semelhanças clínicas, laboratoriais e histológicas com o diabetes humano^{41, 42}. No presente estudo, foi observado uma redução no ganho de peso de animais induzidos ao diabetes. Essa perda de peso, através da redução de massa muscular, parece ser resultante de uma alteração no metabolismo das proteínas na condição de hiperglicemia, que pode ser caracterizado por um aumento no catabolismo protéico e consequente diminuição da massa corporal desses animais^{43, 44}. Os animais induzidos ao diabetes que receberam administração da melatonina antes ou após a confirmação da hiperglicemia também apresentaram ganho de peso reduzido, demonstrando que apesar da administração da melatonina por um período de 20 dias, os animais diabéticos que receberam injeções da indolamina não apresentaram melhora no ganho peso corporal. Dados semelhantes foram encontrados por Paskaloglu et al. (2004)²³, que apesar da administração de melatonina por um período de 8 semanas, esta não estimulou o ganho de peso corporal pelos animais. Por outro lado, o tratamento com insulina resultou em aumento de peso corporal semelhante ao grupo controle, o que indica que este hormônio anabólico atua no metabolismo de proteínas, aparentemente estimulando a síntese protéica⁴⁵.

Estudos demonstram que a administração da melatonina não reduz os valores hiperglicêmicos na condição de diabetes.^{46, 47} Por outro lado, relatos apontam que a administração desse hormônio previamente a indução do diabetes experimental resulta em níveis hiperglicêmicos menores, indicando que a melatonina exerça uma tendência a diminuição da glicemia em ratos⁴⁷. Esses dados corroboram os nossos achados, pois, a melatonina administrada simultaneamente a indução do diabetes pela estreptozotocina

provocou tênue redução da glicemia nesses animais. Indicando assim, uma possível atividade dessa indolamina sobre a secreção de insulina e proteção sobre as células β pancreáticas⁴⁸.

Os achados histopatológicos e histoquímicos sugerem que a melatonina apresentou efeitos benéficos nas alterações encontradas no diabetes, reduzindo aparentemente o acúmulo de glicogênio e o espessamento da membrana basal, bem como parece atenuar a deposição de colágeno no tecido renal desses animais. Da mesma maneira, aparentemente, reduziu a incidência de alterações como a degeneração hidrópica e atrofia tubulares ou glomerulares. Cam et al. (2003)⁴⁶ também demonstraram que o tratamento com a melatonina reduziu as patologias tubulares e glomerulares em comparação a ratos diabéticos não tratados, no entanto, não foi suficiente para produzir diferenças significativas entre os grupos. Já os achados de Gumustekin et al. (2007)²⁶, comprovam que a administração da melatonina reduz as alterações glomerulares e o acúmulo de glicoproteína intratubular nos rins desses animais. Esses dados são consistentes com os nossos resultados, pois confirmam o efeito protetor da melatonina sobre a histopatologia renal.

O índice organossomático dos animais diabéticos apresentou valor significativamente maior em relação aos demais grupos, confirmando a nefromegalia. Como consequência da hiperfiltração glomerular e pelo aumento de proliferação mesangial do diabetes, os rins destes animais apresentam maior tamanho quando comparado ao rim normal ou administrado com insulina, uma vez que este hormônio tem a capacidade de controlar a hiperglicemia do diabetes tipo 1, amenizando então, o principal responsável pelas complicações tardias da enfermidade nos rins^{49,50,51}. Entretanto, vale ressaltar que a administração com melatonina tornou o índice organossomático dos rins desses animais semelhantes aos do grupo controle. Segundo

Pandi-perumal et. al. (2008)⁵², a melatonina atua diretamente em diversos órgãos ao ligar-se a receptores específicos de membrana, como o MT1 e MT2. Esses receptores também são encontrados nos rins, promovendo a atuação da melatonina neste órgão, protegendo e atenuando os efeitos deletérios do diabetes na morfologia renal.

A análise da dosagem hormonal das concentrações de insulina plasmática nos ratos do grupo tratado com insulina confirmou os resultados já citados na literatura, pois, de acordo com Spadella et al. (2010)⁴⁹, animais diabéticos administrados com insulina restabelecem os valores baixos do hormônio resultante da lesão causada nas células β pela estreptozotocina. Sabe-se que os níveis insulínicos estão reduzidos na condição de diabetes tipo 1 tanto em humanos como em animais de experimentação^{5,55}, dados confirmados no nosso estudo, pois os animais diabéticos apresentaram redução nos valores de insulina. Bach et al. (2005)⁵³ demonstraram que a administração da melatonina estimula a secreção de insulina pela células beta do pâncreas, estimulando a recuperação da sua função. Por outro lado, os dados obtidos na pesquisa mostram que a administração da melatonina durante 10 dias após a confirmação do diabetes não apresentou capacidade secretora de insulina. No entanto, a administração do hormônio a partir da indução até o 20º dia, demonstrou uma aparente síntese de insulina nesses animais, mas sem similaridade para os valores normais, demonstrando uma recuperação parcial. Isso pode indicar que a melatonina atua de maneira direta no metabolismo da insulina, evidenciando uma possível atividade reguladora entre os dois hormônios. Além disso, a melatonina apresenta efeitos benéficos na proteção das células beta de ratos diabéticos. Yavuz et al., (2003)²² demonstram que a administração desse hormônio evita o dano oxidativo causado pela estreptozotocina no pâncreas de ratos. Essa evidência pode sugerir um possível efeito protetor da melatonina aplicada

simultaneamente sobre as células pancreáticas dos ratos, que possivelmente ainda apresentaram células com capacidade secretora de insulina.

A função renal, analisada pelos níveis plasmáticos da creatinina e uréia mostrou-se elevada nos animais diabéticos, indicando assim uma lesão renal ^{54,55}. Foi observado no nosso estudo, que a administração da melatonina ou insulina exerceu atividade benéfica nas concentrações destes marcadores, pois os animais dos grupos tratados apresentaram valores plasmáticos de creatinina e uréia similares ao grupo controle, indicando a capacidade protetora da melatonina sobre os rins, melhorando diretamente a função renal. Hara et al., (2001)⁵⁶ utilizando o modelo de nefrotoxicidade induzida em ratos por cisplatina demonstraram os efeitos do tratamento com a melatonina. Nesse modelo de dano renal, assim como no diabetes, ocorre aumento das ROS e perda da função renal, no entanto, a administração da indolamina permitiu a redução dos níveis da uréia, creatinina e excreção de proteínas nesses animais, o que confirma a atuação da melatonina de maneira benéfica regulando a função dos rins.

Nos portadores de diabetes é relatado que a pressão arterial está intimamente associada com a lesão renal e sua evolução é acelerada pela presença de hipertensão arterial ⁵⁷. Cesaretti et al., (2010)⁵⁸ observaram que ratos wistar tornados diabéticos pela administração da estreptozotocina por um período de 12 semanas apresentam um aumento na pressão arterial. Entretanto, na presente pesquisa, foi evidenciado que os níveis pressóricos entre os grupos experimentais não apresentaram diferenças significativas, o que pode ser justificado pelo curto período do quadro de diabetes, aparentemente, não suficiente para levar à um quadro de hipertensão arterial desses animais.

Segundo Singh & Jialal, (2006)⁵⁹ as espécies reativas de oxigênio (ROS), são considerados um dos maiores responsáveis pelo comprometimento da função endotelial

no diabetes. O óxido nítrico apresenta seus níveis reduzidos no quadro de hiperglicemia, pois os níveis excessivos das ROS neutralizam sua atividade, levando consequentemente a um mecanismo de vasoconstrição que pode resultar em aumento de pressão arterial^{60,61}. No entanto, estudos tem mostrado os efeitos da melatonina sobre a síntese de óxido nítrico endotelial, indicando que esta idolamina quando interage com receptores MT1 presentes nas células endoteliais e nas células musculares lisas da artéria caudal de ratos promove potencialização da vasoconstrição, enquanto a interação com os receptores MT2 promove vasodilatação^{62,63}. Os nossos resultados demonstraram que após as administrações de insulina ou melatonina todos os grupos, exceto o grupo diabético, apresentaram valores semelhantes ao grupo controle, com aumento nos níveis deste radical. Isso sugere um efeito protetor da melatonina sobre o endotélio, pois a recuperação da síntese de óxido nítrico pode levar a vasodilatação e controle da pressão arterial.^{64,65,66} Da mesma maneira, a administração da insulina restaurou os níveis de óxido nítrico, confirmando sua ação vasodilatadora previamente demonstrada por Kobayashi & Kamata (2001)⁶⁵.

Silva et al. 2011⁶⁶ relatam que o diabetes induzido pela estreptozotocina em hamsters leva um aumento nas concentrações da peroxidação lipídica. Os nossos resultados confirmam o descrito na literatura, pois o diabetes aumentou significativamente os níveis da peroxidação lipídica no tecido renal dos animais. No entanto, entre os dois grupos administrados com a melatonina, apenas o GDM apresentou redução nos valores de TBARS para níveis encontrados nos animais controle. Isso sugere que a administração da melatonina simultânea de alguma maneira evitou o aumento exacerbado do TBARS, porém, apesar de um estímulo da melatonina desde o dia da indução, este não foi suficiente para reduzir os valores da peroxidação lipídica nos animais deste grupo. Por outro lado, a melatonina administrada após a

instalação da hiperglicemia exerceu efeitos diretos sobre o TBARS, pois 10 dias após a indução pela estreptozotocina já é relatado o aumento da peroxidação lipídica ⁶⁶. Esses achados reforçam o efeito da melatonina como antioxidante e corroboram os resultados observados por Cam et al. (2003) ⁴⁶, pois estes reportam que a administração da melatonina durante 4 semanas reduz os níveis do malonaldeído no homogenato renal de animais diabéticos.

Adicionalmente, a análise dos níveis teciduais da glutathiona reduzida (GSH) não mostrou diferença significativa entre os grupos experimentais. Dados semelhantes foram encontrados por Sudnikovich et al. (2007) ²⁰, onde ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e administrados com melatonina não apresentam alterações na atividade do antioxidante GSH. Entretanto, Vural et al. (2001)²¹ relatam que aplicações de melatonina por um período de um mês previnem a redução da atividade da GSH-Px e da GSH, o que nos faz sugerir que este estímulo da melatonina sobre a capacidade antioxidante endógena pode ser dependente do tempo de aplicação.

Estudos têm apontado que a melatonina pode modular a apoptose, atuando tanto na via extrínseca, ao controlar os receptores de morte, como na via intrínseca ao eliminar radicais oxidantes do citoplasma que podem ser gerados pela mitocôndria e causar danos no DNA que levam à morte programada da célula ^{67,68,69}. Nos rins de animais diabéticos é bem relatado que o dano oxidativo causado pelo acúmulo de ROS e consequente deposição produtos finais de glicação avançada (AGEs), fatores fibrinogênicos como matriz extracelular, colágeno, fibronectina, dentre outros, pode resultar em citotoxicidade e morte celular ⁵. Estudos também indicam que antioxidantes apresentam efeitos promissores sobre a apoptose nos rins de animais com isquemia e reperfusão, pois a administração da melatonina reduziu a apoptose e/ou necrose nos rins de animais nessas condições^{70,71,72}. Na presente pesquisa foi evidenciado o efeito

protetor da melatonina na apoptose renal, pois foi observado redução nos valores de células Tunel-positivas, confirmando que a melatonina pode atenuar a apoptose nos rins de ratos com o quadro de diabetes.

Dessa forma, concluímos que a administração da melatonina após ou simultaneamente a indução do diabetes pela estreptozotocina pode ser benéfica para a histofisiologia renal de animais com o quadro de nefropatia diabética. No entanto, a importância clínica e fisiológica dessa administração exige mais esclarecimentos para melhor compreensão dos mecanismos pelo qual a melatonina exerce seus efeitos benéficos.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não apresentam conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Dave GS, Kalia K. Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2 diabetic patients with and without nephropathy. *Cel Mol Biol*. 2007; 53; 5: 68–8.
2. [Internet] Sociedade Brasileira de Nefrologia: Censo de Diálise 2010. Disponível em<: <http://www.sbn.org.br/leigos/index.php>> censo. Acesso em: 10 de agosto de 2014.
3. United States Renal Data Syste, U S Renal Data System annual report. Bethesda: National Institutes of Health and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.

4. Asaba K, Tojo AML, Onozato A, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kid Intern*, 2005; 67:1890–8.
5. Lagranha C.J, Fiorino P, Casarini DE, et al. Bases glomerulares da nefropatia diabética. *Arqu Bras Endocrinol Metab*. 2007; 51(6):901-2.
6. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative Stress Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and-Cell Dysfunction? *Diabetes*. 2004; 52(1):1-8.
7. Díaz-flores M, Baiza-gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica.. *Gac Méd Méx*. 2004; 140 (4): 437- 8.
8. Tolman KG, Fonseca V, Tan MH, et al. Narrative review: hepatobiliary disease in type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med*. 2004;141: 946–6.
9. Erejuwa, OO, Sulaiman SA, Wahab MS, et al. Antioxidant protection of Malaysian tualang honey In pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Ann Endocrinol*. 2010;71:291-6.
10. Nixdorf SL, Gutierrez IH. Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal Chim Acta*, 2010;659:208-
11. Padillo FJ, Cruz A, Navarrete C. Melatonin prevents oxidative stress and hepatocyte cell death induced by experimental cholestasis. *Free Rad Res*. 2004;38(7): 697–4.
12. Hiriart B M, Morffiz S, Torres KU, et al. Hormona de la oscuridad. *Revista latinoamericana de patologia clinica*. 2012; 59(4): 222-2.
13. Arendt J, Skene, D J. Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Med Rev*. 2005;9: 25-9.
14. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, et al. Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod*. 2009; 81: 445-6.

15. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*; 2001; 7:444–8.
16. Baydas G, Erc E, Catanan H, et al. Effect of melatonin on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell Biochem Fun.* 2001; 19: 37-1.
17. Tan DX, Chen LD, Poeggeler LC, et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J*; 2002; 1:57-0.
18. Siu AW, Maldonado M, Sanchez-hidalgo M, et al. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *J Pineal Res.* 2006; 40:101-9.
19. Anwar MM, Abdel-raheim, MMA, et al. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol.* 2003; 135: 539-7.
20. Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaia SZ, et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol*; 2007; 569; 3:180-7.
21. Vural H, Sabancu TE, Oktay A, et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. *J Pineal Res.* 2001;3:193–8.
22. Yavuz O, Cam M, Bukan N, et al. Protective effect of melatonin on cell damage in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Acta histochem*; 2003; 105(3):261–63.
23. Paskaloglu K, Sener G, Ayangolu-Dulger G. Melatonin treatment protects against diabetes induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. *Eur J Pharmacol* 2004; 499:345-4.
24. Reyes-toso CF, Roson MI, Albornoz LE, et al. Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin. *J Pineal Res.* 2002; 33(2):81-62.

25. Dall'ago P, Silva VO, Angelis KL, et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz J Medic Biol Res.* 2002; 7(35): 843-9.
26. Nirmala A, Saroja S, Vasanthi HH, et al. Hypoglycemic effect of *Basella rubra* in streptozotocin –induced diabetic albino rats. *J. Pharmaco Phytoterapie.* 2009; 1: 2, p. 25-0.
27. Guven A, Yavuz, O, Cam M , et al. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. *Acta histochem;* 2006; 108: 85-3.
28. Ozguner F, Bardak Y, Comlekci S . Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. *Mol Cel Biochem.* 2006; 282: 83–8.
29. Pinheiro LS, Melo AD, Andreazzi AE, et al. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. *Scand J Lab Animal Sci.* 2011; 38(2): 145-2.
30. Losa M, Barzaghi R L A, Mortini P, et al. Determination of the proliferation and apoptotic index in adrenocorticotropin-secreting pituitary tumors. *Am. J. Pathol.* 2000; 156(1):245-1.
31. Wu X, Cheng B, Cai ZD, et al. Determination of the apoptotic index in osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Cancer Cell Int.* 2013;13(56): 1-4.
32. Pereira CEM. Contensor mecânico para ratos. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2001; 16(4).
33. Teixeira AAC, Simões MJ, Wanderley-teixeira V, et al. Evaluation of the implantation in pinealectomized and/or submitted to the constant illumination rats. *Int J Morphol.* 2004; 22(3):189-94.

34. Elias JÁ, Delfino VDA, Barbosa DS, et al. Efeito do Ramipril e da Sinvastatina sobre o estresse oxidativo de ratos diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2008; 52(7): 1131-8.
35. Vilaça-junior PEA, Soares AF, Wanderley-teixeira V, et al. Efeito da administração pré-natal da dexametasona em ratas sobre os perfis glicídicos e hematológicos materno e da prole. *Arq Bras Medic Vet Zoo* 2012;64(3):606-4.
36. Green LC, Luruziaga KR, Wagner DA, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1981; 78: 7764-8.
37. Faraldo AC, Sá-nunes A, Faccioli LH, et al. Nitric oxide production in blowfly hemolymph after yeast inoculation. *Nitric Oxide: Biol Chem.* 2005; 13: 240-6.
38. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann Biochem.* 1979;95: 351–8.
39. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al.. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-5.
40. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Ann Biochem.* 1968;25:192-5.
41. Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50: 537-6.
42. Vander Jagt,DJ, et al. Oxidative stress indices in iddm subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical Biochem*; 2001; 34:265-0.
43. Luciano E, Mello MAR. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo de ratos diabéticos experimentais. *Rev Pau Edu Fís*, 1999; 12: 202-9.

44. Moura LP, Gomes RJ, Leme J , et al. Insulina pancreática de ratos diabéticos tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. *Motricidade*; 2012; 8: 23-2.
45. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46(4): 419-5.
46. Cam M, Yavuz O, Guven A, et al. Protective effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pi Res*; 2003; 35:212–220
47. Abdel-Wahab MH, Abd-Allah AR. Possible protective effect of melatonin and/or desferroxamine against streptozotocin-induced hyperglycaemia in mice. *Pharmacol Res*; 2000; 4: 533–537.
48. Kanter M, Uysal H, Karaca T, et al.. Depression of glucose levels and partial restoration of pancreatic b-cell damage by melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Arch Toxicol*. 2006; 80:362-9.
49. Spadella CS, Macedo CS, Machado JLM, et al. Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana1. *Acta Cir Bras*. 2005; 1:47-3.
50. Flyvbjerg, A.; Landau, D.; Domene, H, et al. The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF binding proteins in experimental diabetic kidney disease. *Metabolism*, 1995; 44(10):67-1.
51. Rasch R, Dorup J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetologia*. 19997;40:802-9.
52. Pandi-perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, et al. Melatonin. *J FEBS*. 2008; 273: 2813-38.

53. Silva FRMB, Szpoganicz B, Pizzolatti MG, et al. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2002; 83: 33-77.
54. Bach AG, Wolgast S, Muhlbauer E, et al. Melatonin stimulates inositol-1,4,5-trisphosphate and Ca^{2+} release from INS1 insulinoma cells. *J. Pineal Research.* 39; 3: 316-3.
55. Ribaldo PDB. O chá verde (*Camellia sinensis*) atenua a nefropatia através da redução da expressão da subunidade NOX-4 da ND(P)H oxidase no diabetes mellitus experimental. 2008. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. Campinas, 2008.
56. Travlos GS, Morris RW, Elwell MR, et al. Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology.* 1996; 107:17-9.
57. Hara M, Yoshida M, Nishijima H, et al. Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal Res.* 2001; 30: 129-8.
58. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications* 2000;14(5):266-71.
59. Cesaretti MLR, Milton G, Ribeiro, BA, Kohlmann-Junior, O. Hemodinâmica sistêmica e função ventricular esquerda de ratos hipertensos tornados diabéticos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2010; 54 : 842-1.
60. Singh, U.; Jialal, I. Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology.* 2006; 13; 3: 129-2.

61. Creager MA, Cooke JP, Mendelson ME, et al. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86: 228-4.
62. Dias RG, Negrão CE, Krieger MH. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. *Arq Bras Cardiol*. 2011; 96:1.
63. Masana M, Dubocovich ML, Krause DN, et al. MT(2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; 302: 1295-2.
64. Ersahin C, Masana MI, Dubocovich, ML. Constitutively active melatonin MT(1) receptors in male rat caudal arteries. *Eur. J. Pharmacol*. 2002; 439; (1-3): 171-2.
65. Kobayashi T, Kamata K. Effect of chronic insulin treatment on NO production and endothelium-dependent relaxation in aortae from established STZ-induced diabetic rats. *Atherosclerosis* 2001; 155: 313-1.
66. Girouard H, Chulak CH, Lejossec, et al. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001;19:1369-7.
67. Silva M, Lima GW, Silva ME, et al. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011; 55-1
68. Kunduzova OR, et al. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/ reperfusion. *The FASEB Journal*. 2003; 17: 872-4.
69. Ferreira CS, Maganhin CC, Simões RS, et al. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2010; 56; 6: 715-8.

70. Fuchs LFP, Guimarães C.R, Maganhin C, et al. Ação da melatonina sobre a apoptose e fator de crescimento endotelial vascular no córtex da adrenal de ratas pinealectomizadas. Rev. Bras. Ginecol. Obstet. 2010; 32; 8: 374-380.
71. Pedreañez A, Rinco J, Romero M, et al. Melatonin decreases apoptosis and expression of apoptosis-associated proteins in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. Nephrol Dial Transplant. 2004; 19; 5: 1098-5.
72. Patschan D, Hildebrandt A, Rinndeburger J. The hormone melatonin stimulates renoprotective effects of "early outgrowth" endothelial progenitor cell in acute ischemic kidney injury. Am J Physiol Renal Physiol 2012; 30: 1305-12

Tabela 1. Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.

simultânea; GDI – grupo diabético insulina.

Grupos	Antes da indução do diabetes	Após indução do diabetes	Meio do tratamento (10º dia)	Fim do tratamento (20º dia)
GC	95,40 $\pm$ 3,44aA	96,01 $\pm$ 4,55bA	99,21 $\pm$ 1,09cA	102,77 $\pm$ 5,84cA
GD	94,89 $\pm$ 1,11aC	350,16 $\pm$ 7,61aB	395,19 $\pm$ 9,15aA	401,43 $\pm$ 1,98aA
GDM	97,12 $\pm$ 2,94aC	345,92 $\pm$ 5,22aB	399,70 $\pm$ 4,09aA	406,17 $\pm$ 8,12aA
GDMS	101,43 $\pm$ 3,67aC	349,33 $\pm$ 8,01aA	317,30 $\pm$ 3,99bB	314,75 $\pm$ 4,91bB
GDI	96,72 $\pm$ 2,04aB	347,83 $\pm$ 6,66aA	99,60 $\pm$ 1,88cB	91,50 $\pm$ 7,89cB
P	0,0654	0,0012	0,0155	0,0453

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e miúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

Tabela 2. Média $\pm$ desvio-padrão dos níveis plasmáticos de óxido nítrico (μmol de NO^2 / μmol de plasma). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.

Grupos	Antes da indução do diabetes	Metade do tratamento (10º dia)	Fim do tratamento (20º dia)
GC	26,81 $\pm$ 1,76aA	27,01 $\pm$ 3,19aA	29,66 $\pm$ 4,03aA
GD	24,05 $\pm$ 2,97aA	5,27 $\pm$ 0,77cB	6,21 $\pm$ 1,32bB
GDM	29,40 $\pm$ 2,62aA	4,43 $\pm$ 1,93cC	24,50 $\pm$ 3,28aA
GDMS	27,52 $\pm$ 2,00aA	14,15 $\pm$ 2,56bB	26,14 $\pm$ 2,66aA
GDI	28,37 $\pm$ 1,39aA	3,99 $\pm$ 2,29cB	27,76 $\pm$ 1,00aA
P	0,1211	0,0312	0,0105

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

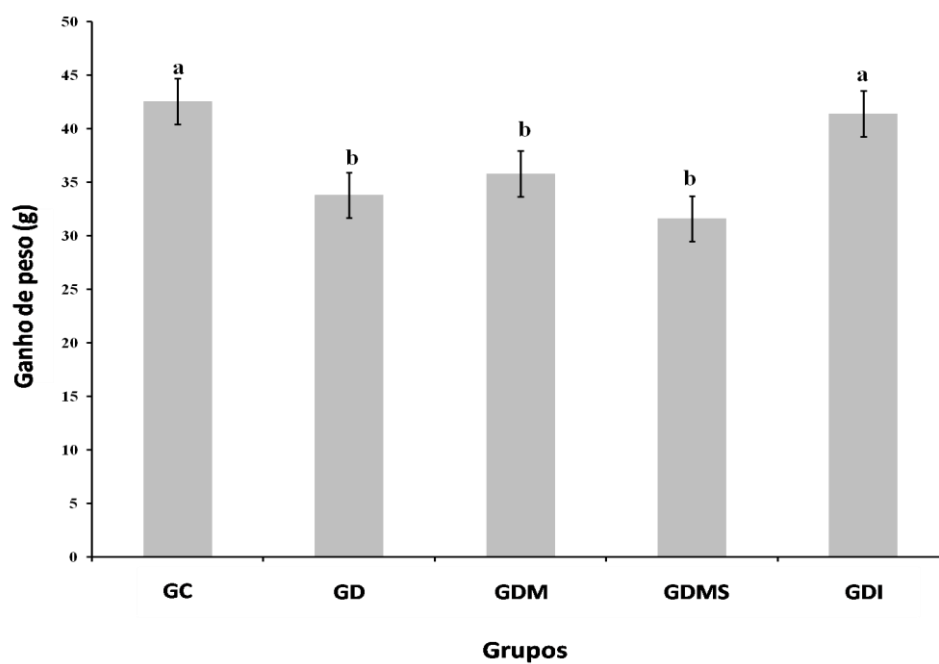


Figura 1. Gráfico do ganho de peso dos animais ao longo do período experimental (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

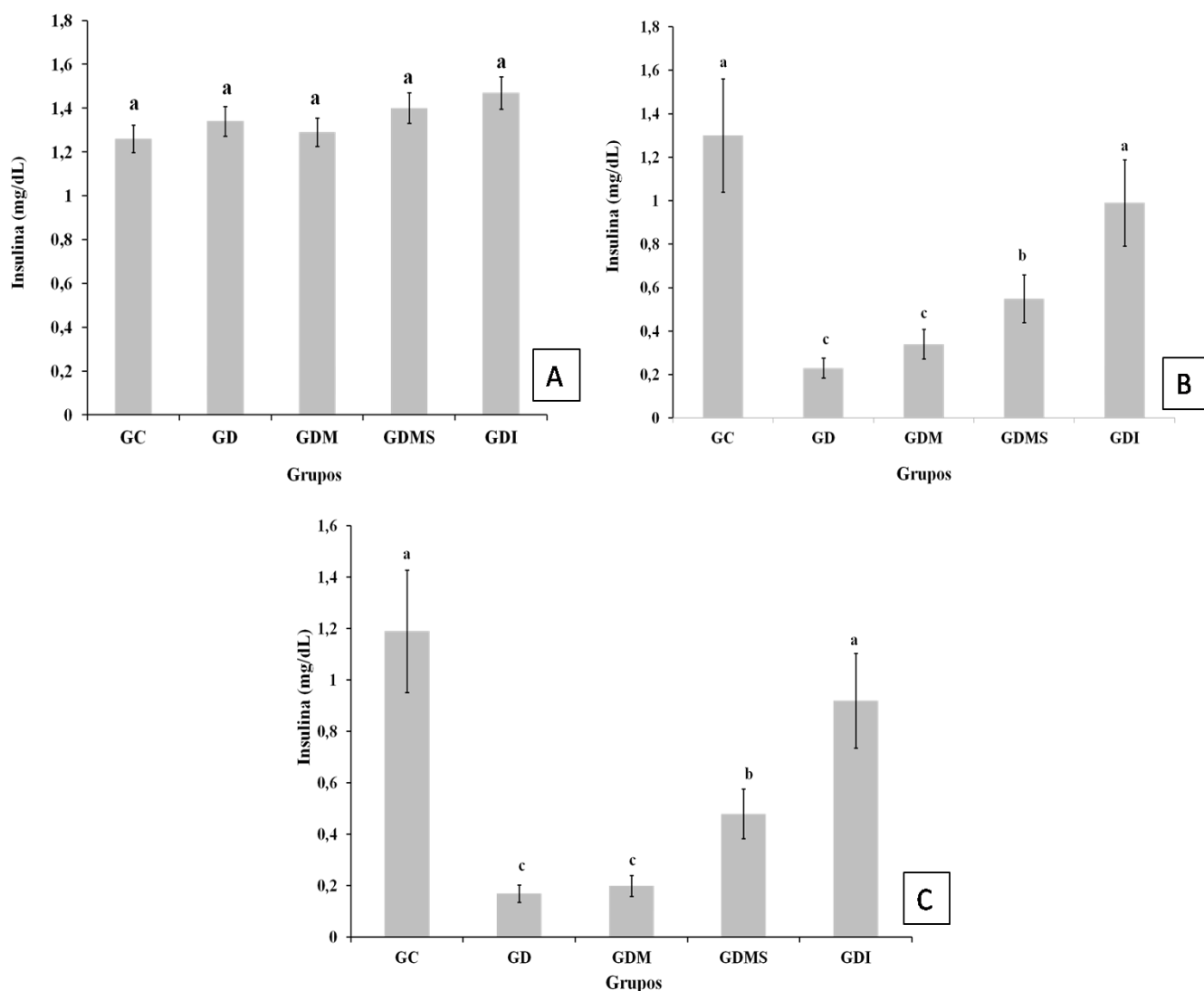


Figura 2. Níveis plasmáticos do hormônio insulina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina.. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

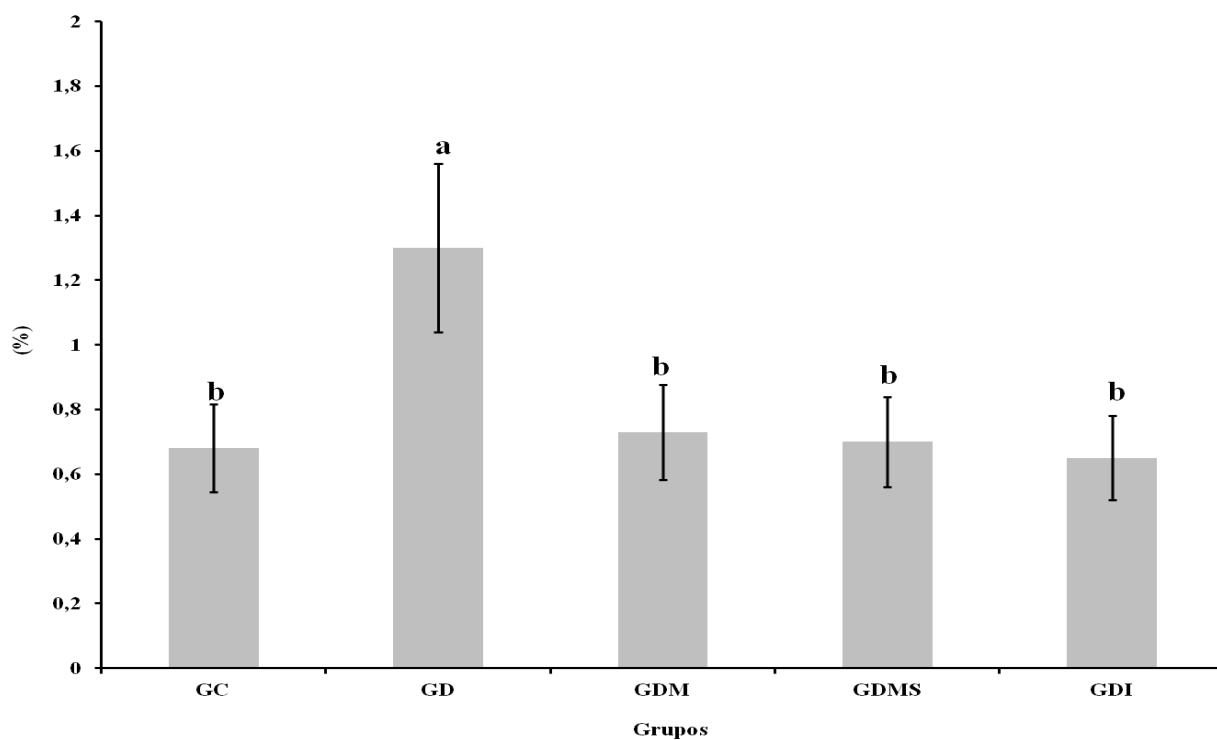


Figura 3. Índice organossomático (IO) dos rins dos animais após 20 dias de tratamento dos diferentes grupos experimentais (%). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

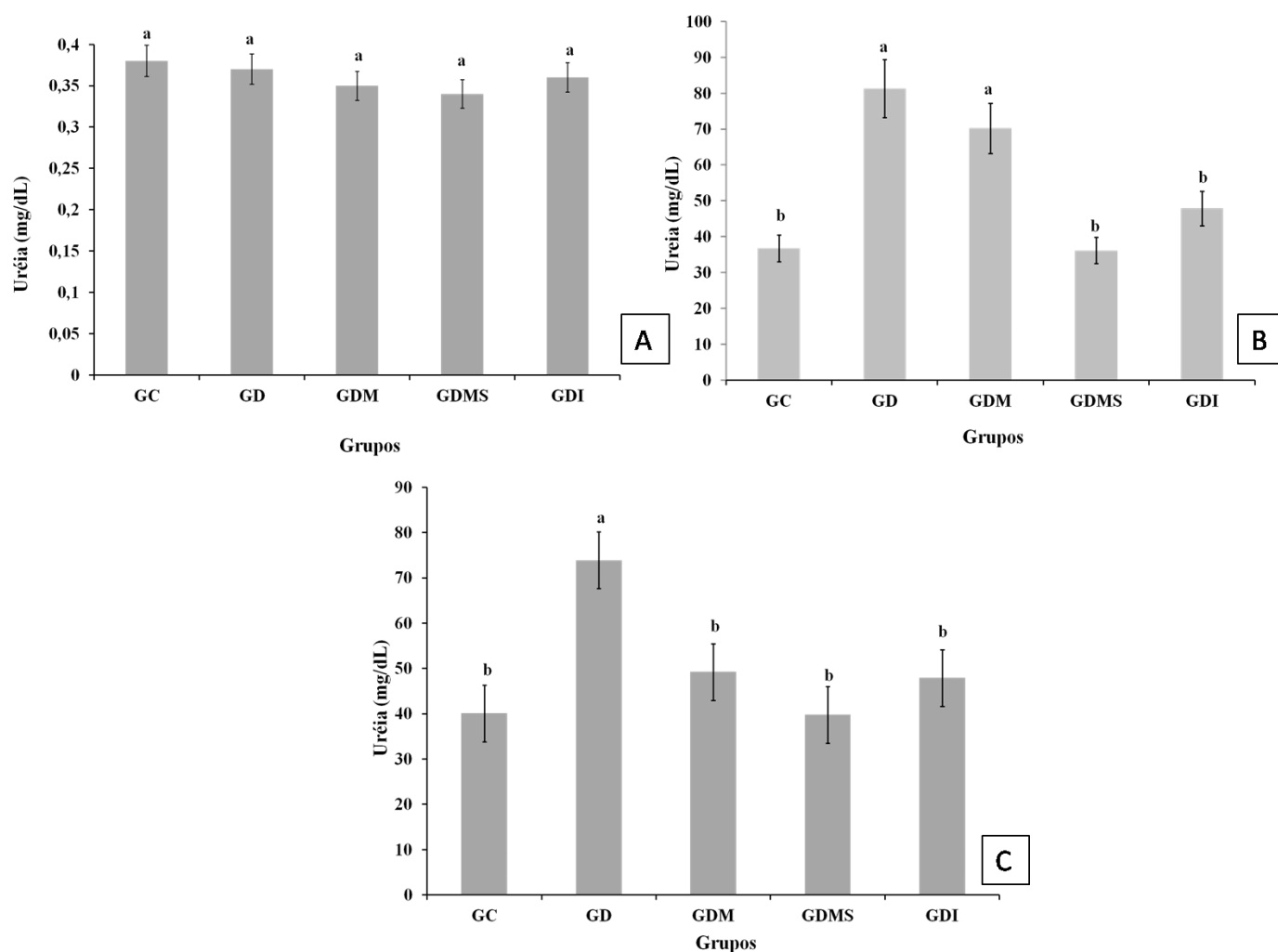


Figura 4. Níveis plasmáticos de uréia (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações.* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

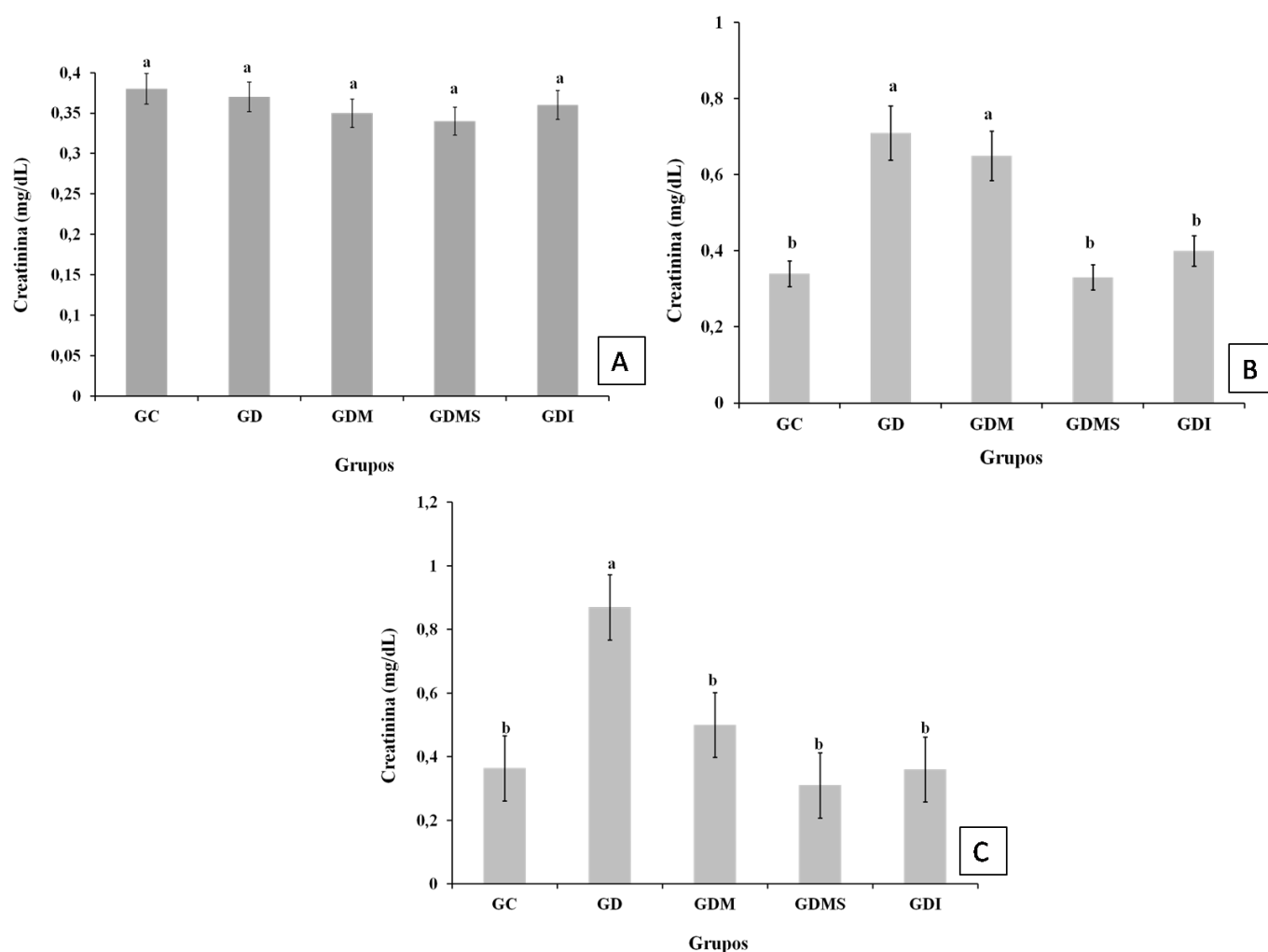


Figura 5. Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. **A-** grupos experimentais antes da indução do DM; **B-** grupos experimentais após 10 dias das administrações; **C-** grupos experimentais após 20 dias das administrações *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

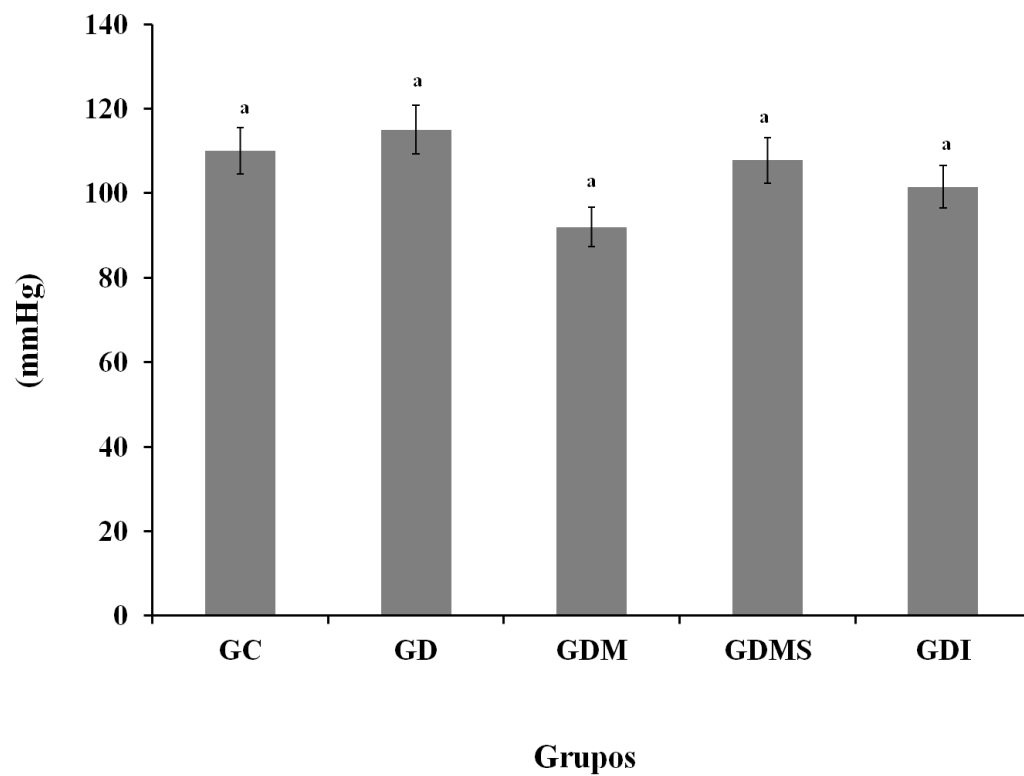


Figura 6. Níveis pressóricos dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (mmHg). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. * Teste de Kruskal-Wallis Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)

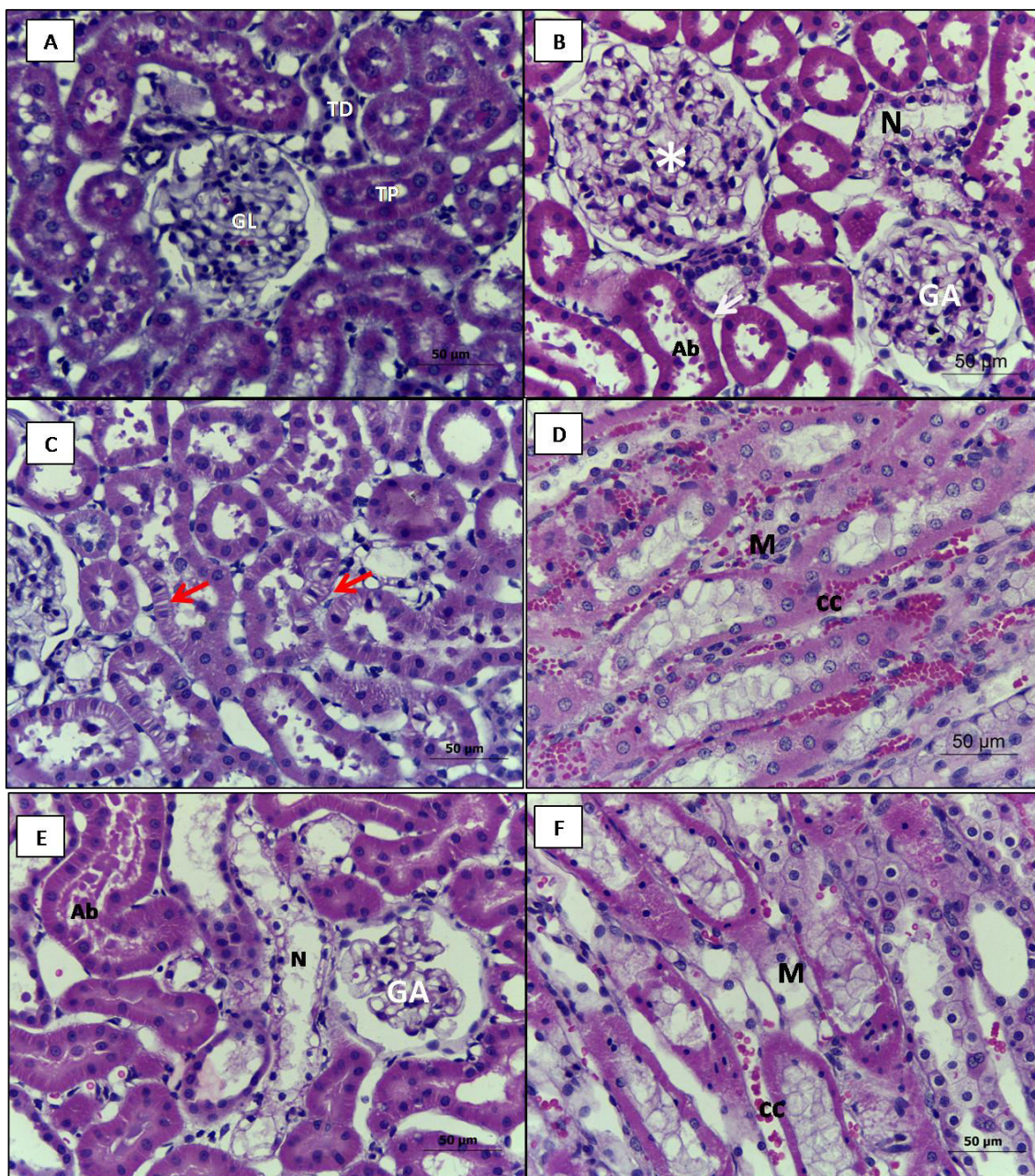


Figura 7. Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos experimentais, H.E. A – grupo controle; (B – D) – grupo diabético – (E-F) – grupo diabético melatonina simultânea; (G e H) – grupo diabético insulina; GL – glomérulo; TP – tubulo contorcido proximal; TD – túbulo contorcido distal; * - glomerulite membranoproliferativa; GA – glomérulo atrófico; seta branca – atrofia tubular; N- nefrose tubular; Ab – albuminúria; seta vermelha – degeneração hidrópica; M – Região medular; cc –congestão

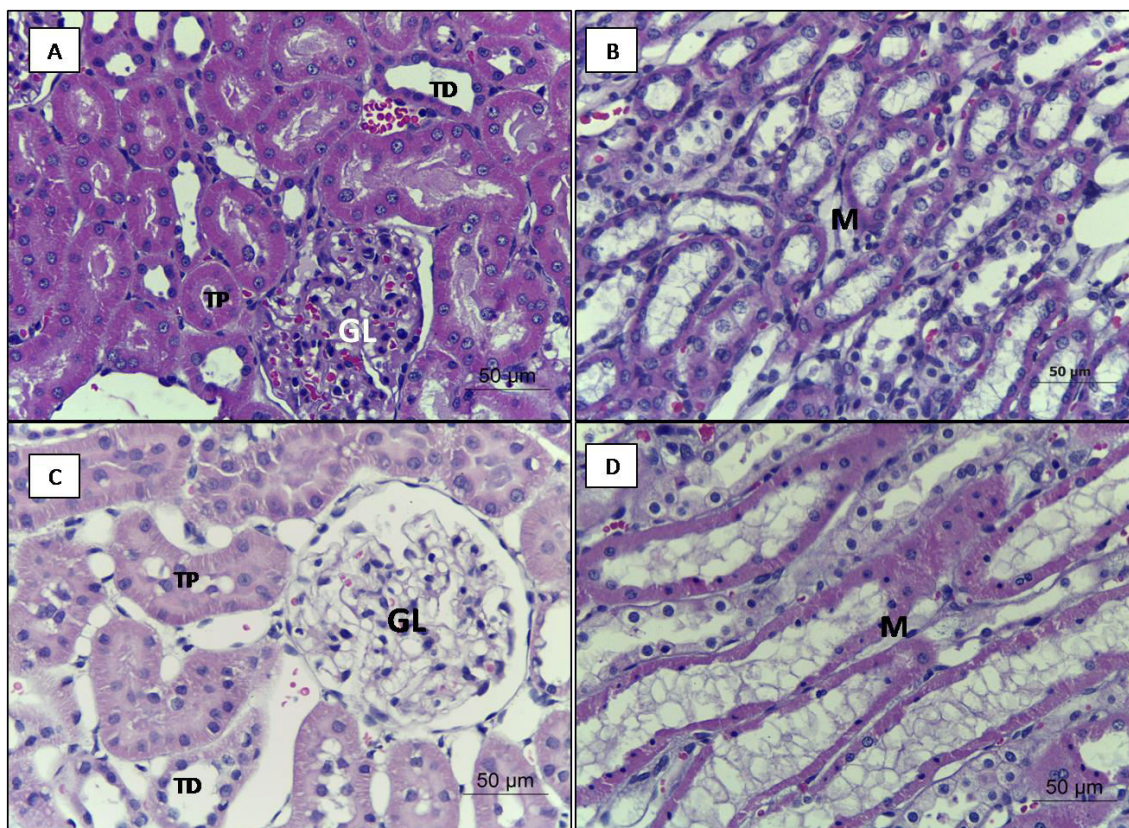


Figura 8. Fotomicrografia dos rins dos animais dos grupos experimentais, H.E. (A – B) – grupo diabético melatonina simultânea; (C – D) – grupo diabético insulina; GL – glomérulo; TP – túbulo contorcido proximal; TD – túbulo contorcido distal; M – Região medular;

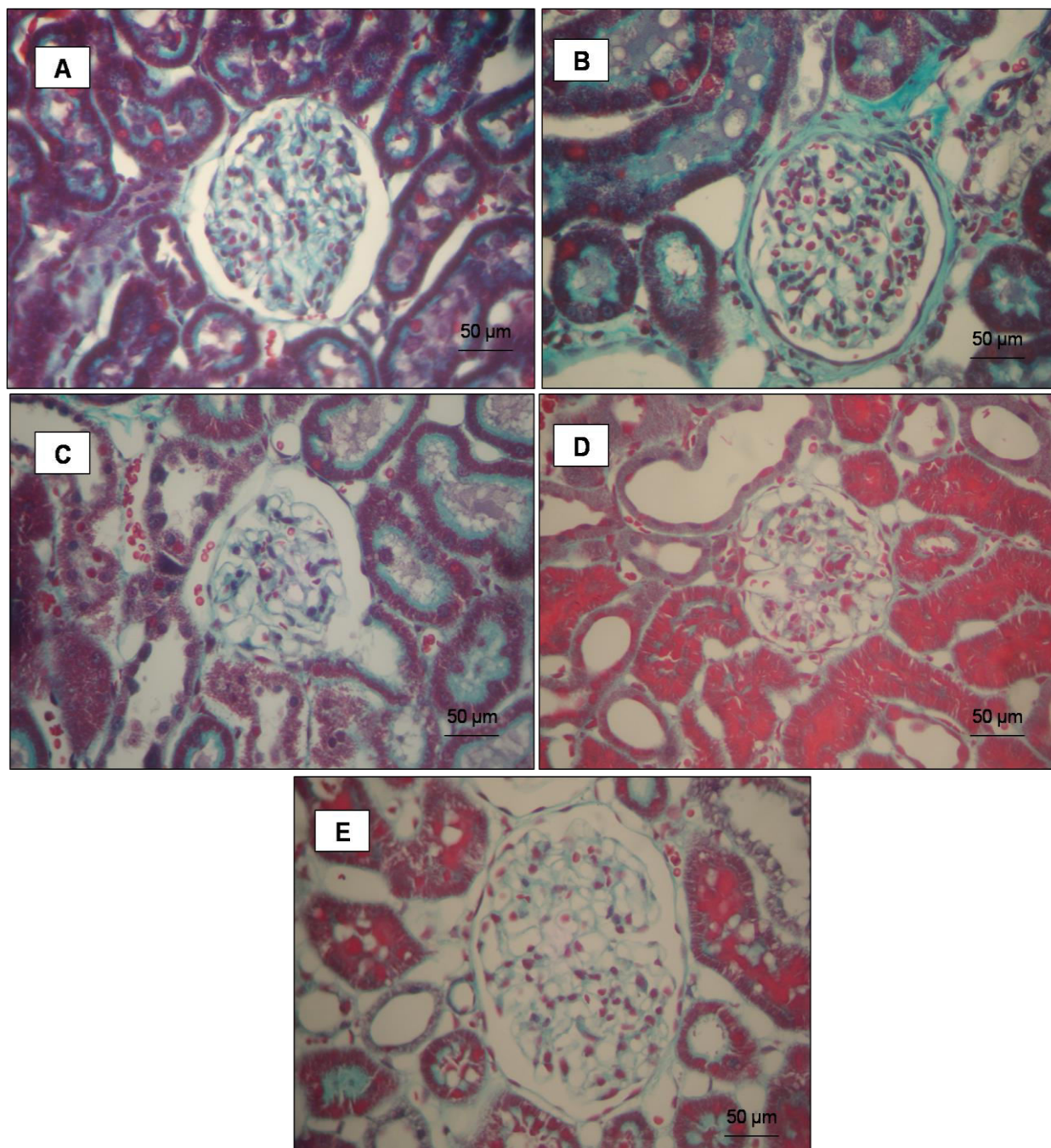


Figura 9. Fotomicrografia da histoquímica dos rins. (A) – grupo controle; (B) – grupo diabético; (C) – grupo diabético melatonina; D- grupo diabético melatonina simultânea; (E) – grupo diabético insulina. Coloração:Tricômico de Gomori. Marcação azul, fibras colágenas.

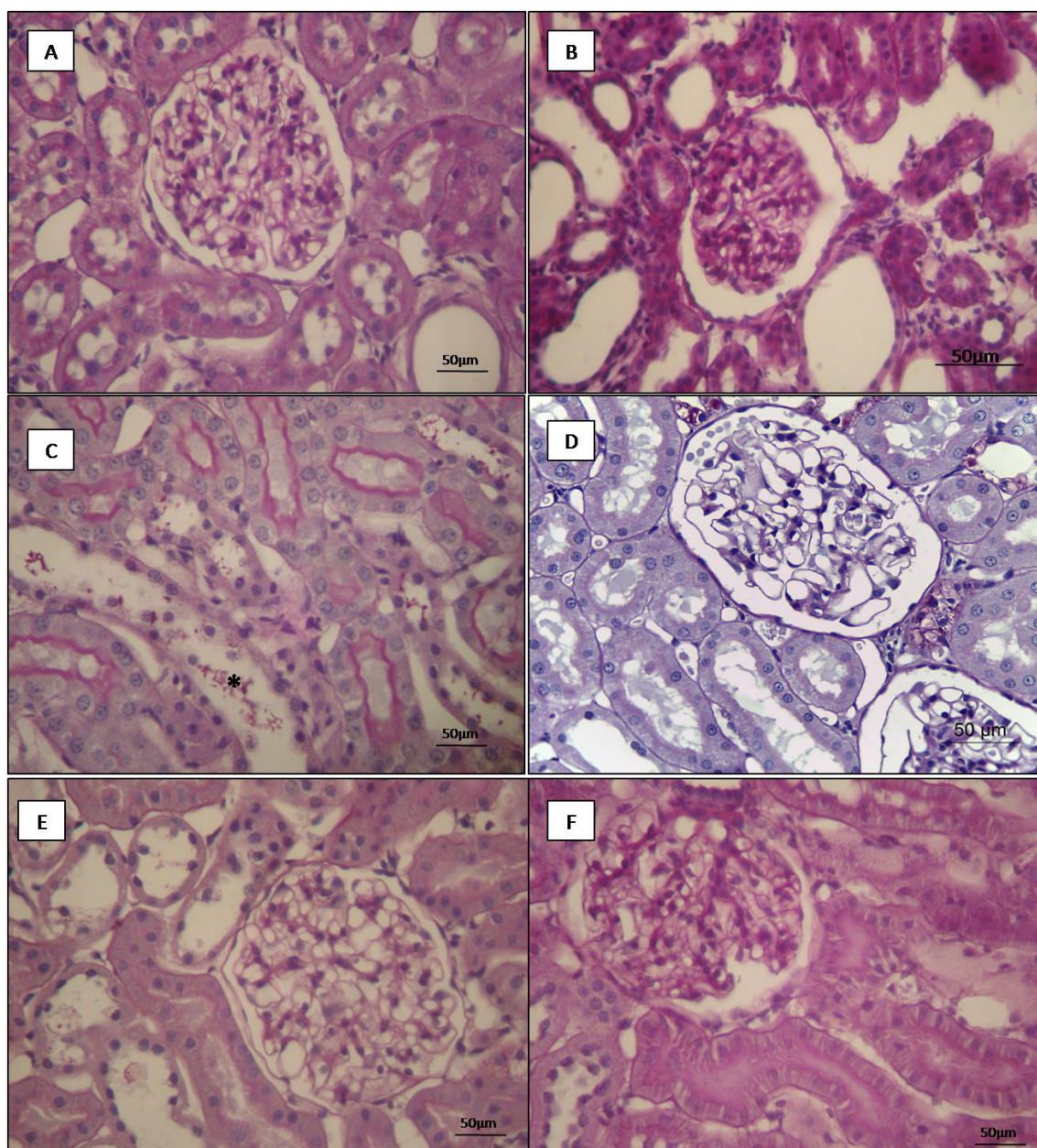


Figura 10. Histoquímica dos rins dos grupos experimentais. (A) - grupo controle; (B - C) – grupo diabético; (D) – grupo diabético melatonina; (E) – grupo diabético melatonina simultânea; (F) – grupo diabético insulina; * - albuminúria; Coloração P.A.S. Marcação em vermelho, glicopolissacarídeos.

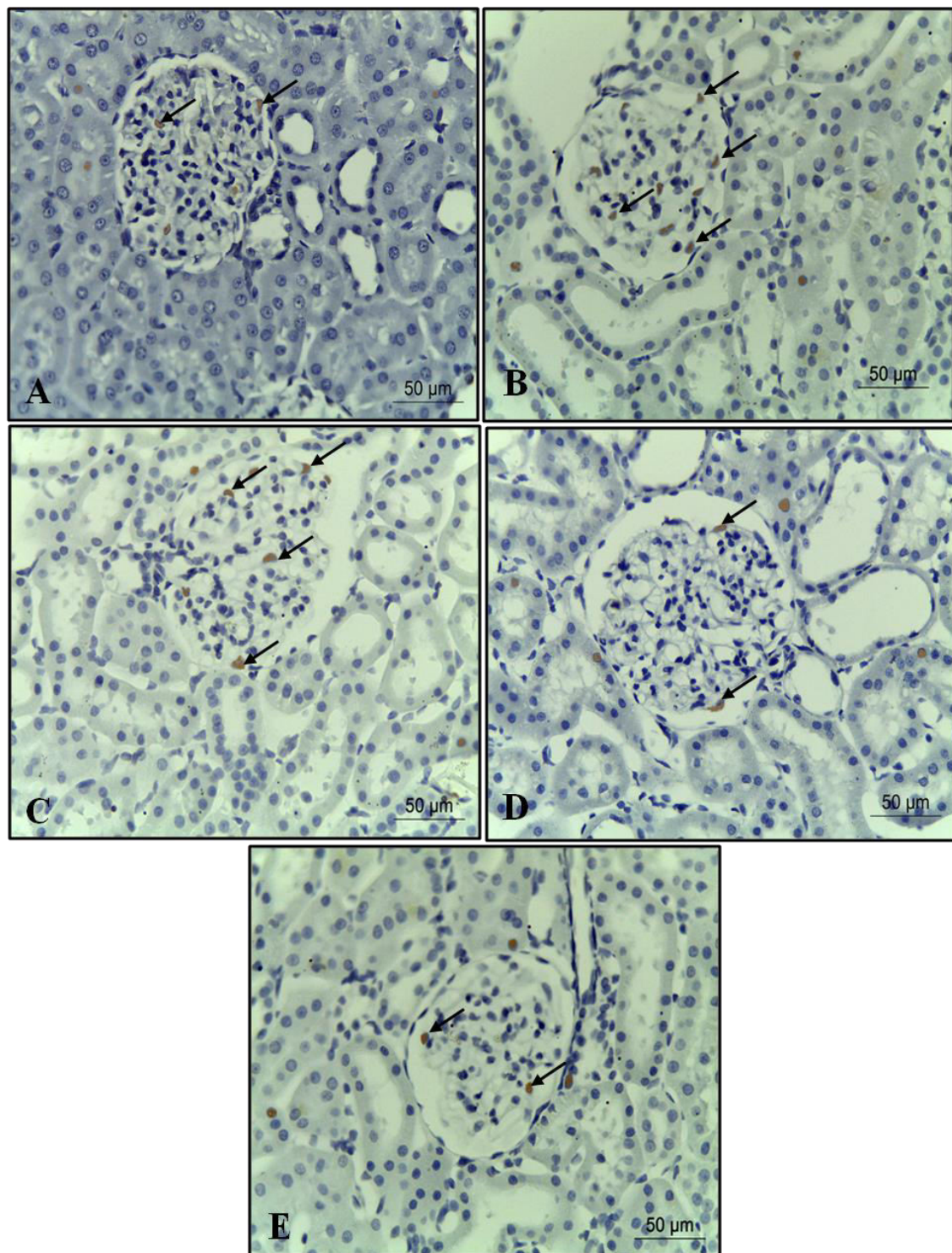


Figura 11. Glomérulos renais mostrando podócitos Túnel-positivos (setas) dos grupos experimentais. (A)- grupo controle; (B) - grupo diabético; (C) – grupo diabético melatonina; (D) – grupo diabético melatonina simultânea; (E) - grupo diabético insulina. Contra –coloração: Hematoxilina.

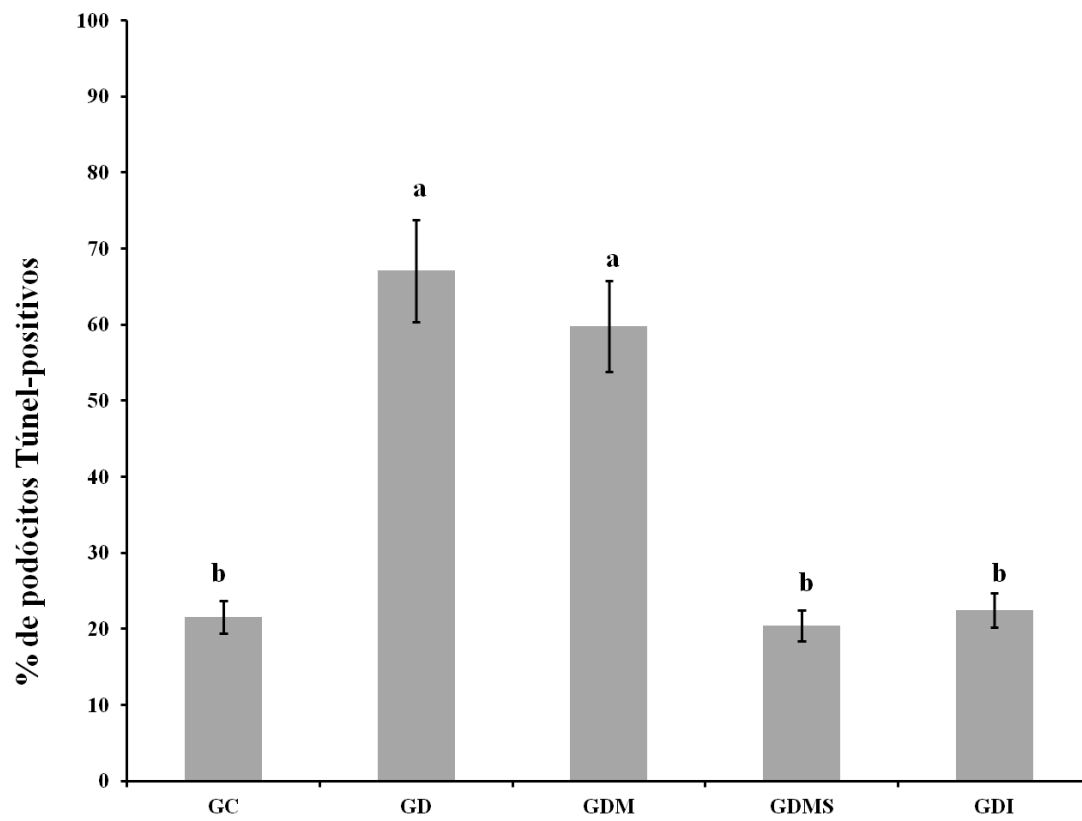


Figura 12. Índice apoptótico (IA) nos glomérulos renais. *Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).

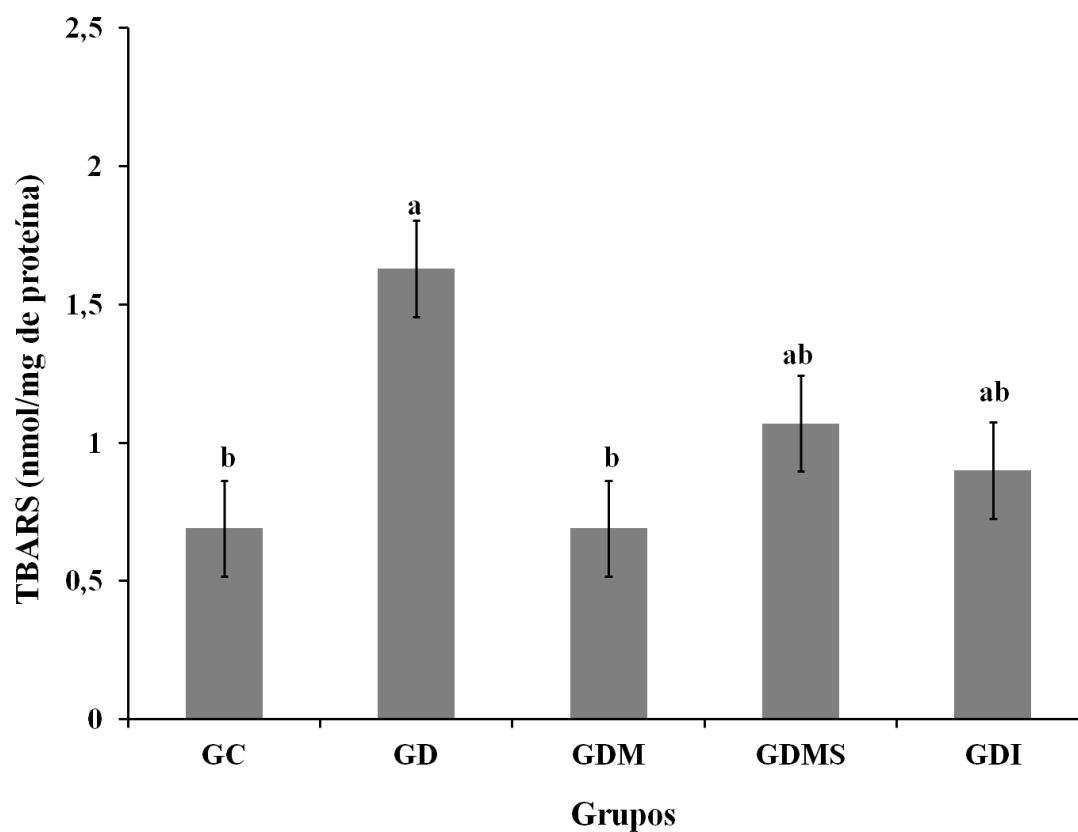


Figura 13. Valores de TBARS nos rins dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$)

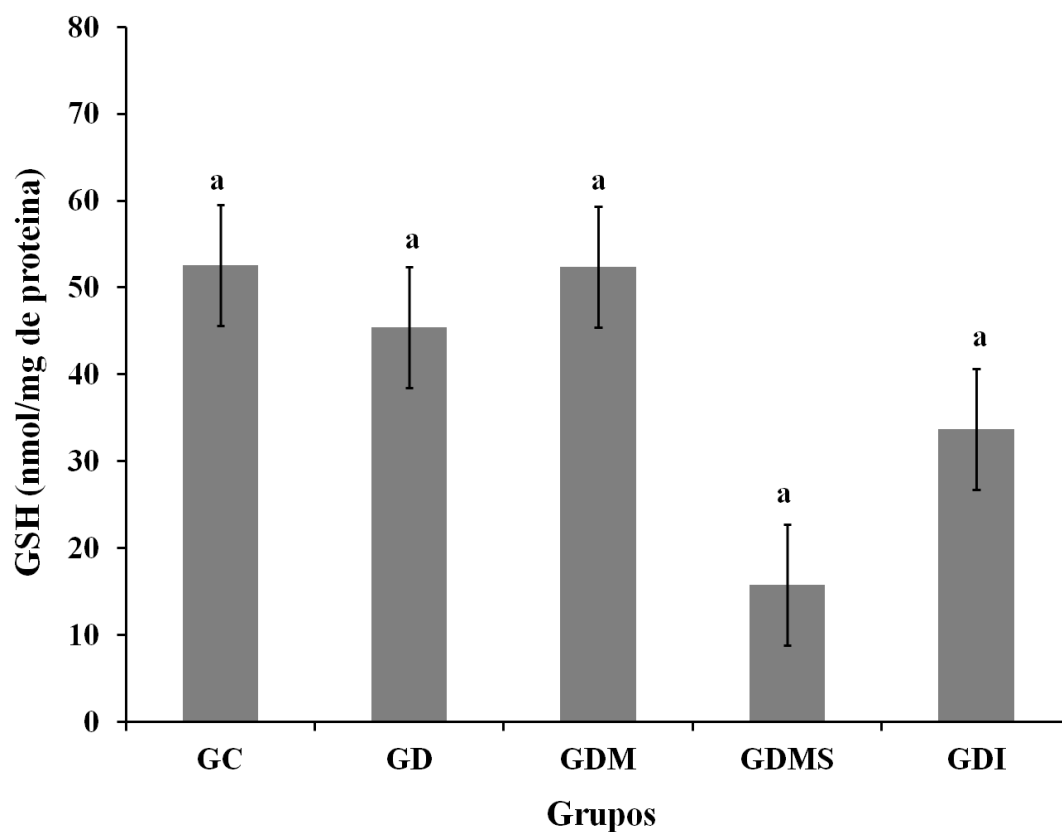


Figura 14. Valores de GSH nos rins dos animais após 20 dias de tratamento nos diferentes grupos experimentais (nmol/mg de proteína). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDM – grupo diabético melatonina; GDMS – grupo diabético melatonina simultânea; GDI – grupo diabético insulina. teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P < 0,05$).