



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

MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA

ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICO DO CÉREBRO DE
RATOS DIABÉTICOS, INDUZIDOS PELA ESTREPTOZOTOCINA, APÓS
TRATAMENTO COM MELATONINA.

RECIFE

2018

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

MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA

**Aspectos morfológicos e imunohistoquímico do cérebro de ratos diabéticos,
induzidos pela estreptozotocina, após tratamento com melatonina.**

**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 (a):

Prof.^a Dr.^a Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

B222a Baptista, Marina Gomes Pessoa.
 Aspectos morfológicos e imunohistoquímico do cérebro de ratos diabéticos, induzidos pela estreptozotocina, após tratamento com melatonina / Marina Gomes Pessoa Baptista. – Recife, 2018.
 68 f. : il.

 Orientador(a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.
 Coorientador(a): Valéria Wanderley Teixeira.
 Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2018.
 Referencias e apêndices.

 1. Diabetes 2. Cérebro 3. Melatonina 4. Citocinas 5. Apoptose
 6. Morfometria 7. Ratos I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, orient.
 II. Teixeira, Valéria Wanderley, coorient. III. Título

CDD 636.089

MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICO DO CÉREBRO DE
RATOS DIABÉTICOS, INDUZIDOS PELA ESTREPTOZOTOCINA, APÓS
TRATAMENTO COM MELATONINA.**

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.

20 de Fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA:

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

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

Prof^a Dr.^a Ismaela Maria Ferreira de Melo - UNIBRA

Prof.^a Dr.^a Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório – UFPE

**RECIFE
2018**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus, por ter me feito chegar até aqui, me dando força, coragem e proteção, estando comigo em todos os momentos dessa caminhada.

Aos meus pais Miguel e Jacqueline, por sempre acreditar que eu era capaz, por me dar todo apoio necessário e por me fazerem acreditar que tudo era possível. Nenhum agradecimento seria suficiente por tudo que fizeram por mim. Eu amo vocês.

As minhas irmãs Marília e Mariana, minhas companheiras, cúmplices, que me deram tanto amor durante essa jornada, um apoio incondicional fundamental para que eu conseguisse chegar até aqui.

A minha Tia Juliana, a minha avó Ana Maria, e ao meu tio Felipe por todo carinho, orações, compreensão e palavras de incentivo.

Aos meus orientadores, Álvaro Teixeira e Valéria Teixeira, pela oportunidade, por todos os ensinamentos, paciência e pela orientação para que eu conseguisse realizar este trabalho. Muito obrigada.

A Cintia Giselle, que dividiu comigo todo seu conhecimento, e esteve sempre pronta a ajudar. Só tenho a agradecer por todo seu apoio, paciência e amizade. Você foi essencial para mim, obrigada!

A Yuri Albuquerque, Carolline Guimarães e Rebeca Alves por todo apoio, incentivo, ajuda e amizade durante a realização deste trabalho. Vocês tornaram tudo mais fácil e agradável. Obrigada por cada dia.

Aos meus companheiros de laboratório, Aline Mariano, Hilda Michelly, Érique Alves, Ilka Duarte, Ketsia Marinho, Clóvis Lapa, Anthony Marcos, Bárbara Brooklyn, Falber Ximenes, Matheus Castro e Vinicius Santiago, por toda ajuda e por tornar o ambiente de trabalho mais divertido.

A Hanna Gracie, Eva Luana, a Técnica Maria Edna Barros por todo auxílio me dado e por todos os ensinamentos.

As amigas de graduação que sempre se mantiveram presentes em todos os momentos, Marcela Vieira, Priscila Oliveira e Camila Amaral.

A Paulo Fernandes pelo companheirismo e cumplicidade durante todo este trabalho, por toda paciência, amizade e carinho.

Aos bioteristas André e Renata por todo suporte dado aos animais, pela ajuda e amizade. Muito obrigada.

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa, a Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal por conceder as instalações para que fosse possível realizar este trabalho.

Agradeço a todos vocês por tudo, sem vocês não chegaria até aqui, muito obrigada!

RESUMO

Sabe-se que o sistema nervoso central é vulnerável a complicações originadas pelo diabetes levando ao aumento do estresse oxidativo no cérebro, resultando em lesões no córtex cerebral dentre outras regiões. A insulina e hipoglicemiantes ainda são os tratamentos mais utilizados, entretanto, pesquisas atuais com modelo experimental do diabetes sugerem a utilização de antioxidantes como, por exemplo, a melatonina. Assim, testamos a hipótese de que a melatonina exógena pode diminuir ou prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro de ratos. Foram utilizados 50 ratos albinos, divididos em 5 grupos: **GC**: ratos sem indução ao diabetes; **GD**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com insulina; **GDMI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina e insulina simultaneamente. O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg). A insulina (5 U/dia) foi administrada por via subcutânea e a melatonina (10 mg/kg) pela água de beber. Ambos tratamentos foram realizados durante 30 dias após a indução. Foram analisados o peso dos animais, do cérebro, as citocinas IL-6 e TNF- α , apoptose, glicogênio, além da morfometria e histopatologia do córtex frontal. Os resultados mostraram que o córtex cerebral dos animais diabéticos apresentaram degeneração axonal, redução do número de neurônios no córtex, redução do glicogênio, aumento da expressão do IL-6 e TNF- α , elevação do índice apoptótico, além da redução do peso dos animais e do cérebro. O tratamento com melatonina associada ou não a insulina preveniu tais efeitos. Assim, concluímos que a melatonina associada ou não a insulina pode ser uma alternativa na prevenção dos efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro.

Palavras-chave: diabetes, cérebro, melatonina, citocinas, apoptose, morfometria, ratos.

ABSTRACT

It is known that the central nervous system is vulnerable to complications caused by diabetes. This complications leads to increased oxidative stress in the brain, resulting in damage to the cerebral cortex among other regions. Insulin and hypoglycemic agents are still the most widely used treatments, however, current research with an experimental model of diabetes suggests the use of antioxidants, such as melatonin. Thus, we tested the hypothesis that exogenous melatonin may decrease or prevent the effects of diabetes in the frontal cortex of rat brain. Fifty albino rats were divided into 5 groups: **GC**: rats without diabetes induction; **GD**: diabetic rats induced by streptozotocin; **GDM**: streptozotocin-induced and melatonin-treated diabetic rats; **GDI**: diabetic rats induced by streptozotocin and treated with insulin; **GDMI**: diabetic rats induced by streptozotocin and treated with melatonin and insulin simultaneously. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60 mg/kg). Insulin (5 U/day) was administered subcutaneously and melatonin (10 mg/kg) by drinking water. Both treatments were performed for 30 days after induction. The animals' weight, the cytokines IL-6 and TNF- α , apoptosis, glycogen, and morphometry and histopathology of the frontal cortex were analyzed. The results showed that the cerebral cortex of the diabetic animals presented axonal degeneration, reduced number of neurons in the cortex, reduced glycogen, increased IL-6 and TNF- α expression, elevated apoptotic index, and reduced animal weight and the brain. Treatment with melatonin associated or not with insulin prevented such effects. Thus, we conclude that melatonin associated or not with insulin may be an alternative in preventing the effects of diabetes in the frontal cortex of the brain.

Key words: diabetes, brain, melatonin, cytokines, apoptosis, morphometry, rats.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Introdução.....	11
2. Revisão de Literatura.....	14
2.1 Diabetes Mellitus.....	14
2.2 Cérebro e complicações cerebrais do diabetes melitus.....	17
2.3 Melatonina.....	20
2.4 Melatonina e diabetes.....	21
2.5 Melatonina no cérebro.....	23
2.6 Citocinas inflamatórias e diabetes.....	24
2.6.1 Interleucina (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α).....	25
2.7 Insulina no cérebro.....	26
3. Referências.....	28

CAPÍTULO II

Avaliação histomorfométrica e imunohistoquímica do córtex cerebral frontal em ratos diabéticos após o tratamento com melatonina.....	40
Resumo.....	41
Abstract.....	42
1. Introdução.....	43
2. Material e métodos.....	44
3. Resultados.....	59
4. Discussão.....	51
5. Referências.....	53

Lista de Figuras

Figura 1. Peso dos cérebros dos animais dos grupos experimentais. GC - grupo controle; GD - grupo diabético; GDI - grupo diabético tratado com insulina; GDM - grupo diabético tratado com melatonina; GDMI - grupo diabético tratado com melatonina/insulina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Dunn ($p < 0,05$).....62

Figura 2. Fotomicrografia da substância branca do cérebro dos animais dos grupos experimentais. A (GC); B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Percentual de fibras nervosas sem axônio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). H.E. Setas - fibras nervosas sem axônio.....63

Figura 3. Fotomicrografia do córtex cerebral dos animais dos grupos experimentais. A (GC); B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Quantificação em pixels do teor de glicogênio. Notar redução significativa no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). PAS.....64

Figura 4. Estimativa do número de neurônios do córtex cerebral dos animais dos grupos experimentais. GC - grupo controle; GD - grupo diabético; GDI - grupo diabético tratado com insulina; GDM - grupo diabético tratado com melatonina; GDMI - grupo diabético tratado com melatonina/insulina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Dunn ($p < 0,05$).....65

Figura 5. Imunohistoquímica para IL-6 no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).....66

Figura 6. Imunohistoquímica para TNF- α no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias

seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn (p<0,05).....67

Figura 7. Imunohistoquímica para apoptose no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Índice apoptótico. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn (p<0,05).....68

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma condição crônica caracterizada por um estado de hiperglicemia resultante da destruição de células beta do pâncreas ou pela resistência a ação da insulina e distúrbios em sua secreção (TAVARES et al., 2011 ; GOMES et al., 2016), causando danos em vários sistemas do organismo (LEAHY, 2005), além da perda de funções e falência de diversos órgãos (SUMITA ; ANDRIOLLO, 2008) como olhos, rins, nervos, coração e vasos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), a predominância do diabetes atingiu 387 milhões de pessoas no ano de 2014, e acredita-se que até o ano de 2035 poderão surgir aproximadamente 205 milhões de novos casos (CARDOSO et al., 2017). O aumento da urbanização vem ocasionando em mudanças na dieta, redução da atividade física e mudanças no estilo de vida da população. Essas mudanças contribuem para um progresso nas taxas de obesidade e consequentemente para um aumento na prevalência do diabetes mellitus em todo o mundo (MENDES et al., 2017). Segundo a sociedade brasileira de diabetes, atualmente já são registrados 12 milhões de portadores desta doença, e é importante ressaltar que o diabetes mellitus é considerada uma das principais causas de mortalidade (CORREA et al., 2017), além de contribuir para o aparecimento de diversas complicações a longo prazo como neuropatia, nefropatia, retinopatia e doenças coronárias (NASKAR et al., 2017).

A disfunção neurológica é comum em pacientes com o DM e é frequentemente relacionada com um controle glicêmico ineficaz (PINHEIRO et al., 2015). As consequências do diabetes no cérebro a longo prazo se apresentam a nível estrutural, neurofisiológico e neuropsicológico. Além disso, diversos fatores patogênicos parecem estar relacionados a origem da disfunção cerebral causada pelo diabetes, como momentos de hipoglicemia, alterações cerebrovasculares, a função da insulina no cérebro e mecanismos de danos estimulados pela hiperglicemia (MURIACH et al., 2014). Foi comprovado também que os cérebros diabéticos apresentam características que são consideradas como responsáveis por um envelhecimento precoce, como o aumento do estresse celular que podem resultar em danos oxidativos, e em apoptose. A apoptose, morte programada das células, pode também

34 ser induzida pelo estresse oxidativo, inibindo o processo da neurogênese durante a
35 fase embrionária (BIESELS et al., 2002 ; CUI et al., 2006).

36 O diabetes e doenças neurodegenerativas são exemplos de processos
37 patológicos associados a alterações inflamatórias crônicas que resultam em
38 modificações significativas na função dos tecidos e também na homeostase (PACHER
39 et al., 2007 ; OKIN; MEDZHITOV, 2012). Diversos estudos mostraram que citocinas
40 inflamatórias são fundamentais no progresso das complicações diabéticas
41 microvasculares, incluindo a neuropatia (NAVARRO ; MORA, 2005). A inflamação
42 crônica de baixo grau e ativação do sistema imune inato são conhecidos por estarem
43 significativamente relacionados a patogênese do diabetes mellitus (NAVARRO-
44 GONZÁLEZ; MORA-FERNZANDEZ, 2008). As principais citocinas envolvidas nesse
45 processo são IL-1, IL-6 e TNF- α (ALEXANDRAKI et al., 2006).

46 Para estabilização e melhora das complicações cerebrais causadas pelo DM,
47 é necessário um controle glicêmico rigoroso, para que seja possível manter o paciente
48 em um estado de normoglicemia (TESFAYE et al., 2010). Diversas evidências indicam
49 que fármacos antioxidantes sejam uma excelente alternativa para o tratamento de
50 neuropatias (NASCIMENTO et al., 2016).

51 A melatonina, também conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, é derivada
52 da serotonina que tem o aminoácido triptofano como precursor, e é o principal
53 hormônio produzido pela pineal, apresentando uma alta solubilidade e uma coloração
54 amarelo-claro. O seu transporte é realizado pelo plasma conectado a proteínas como
55 a albumina. (SUMAYA et al., 2005 ; MAGANHIN et al., 2008). Este hormônio é
56 considerado um antioxidante terminal, com capacidade de detoxificação de radicais
57 livres em concentrações fisiológicas e farmacológicas, além de estimular enzimas
58 antioxidantes (SOUZA et al., 2016).

59 Os efeitos neuroprotetores da melatonina pode ser realizada por interações
60 com seus receptores. Esses receptores ativados no cérebro participam de processos
61 como a regulação dos níveis de fatores neurotróficos, nos quais estes fatores tem uma
62 importante função na manutenção de células neuronais (KABADI; MAHER, 2010).

63 Nos últimos anos, foram demonstradas muitas evidências que a melatonina
64 pode ser um elemento fundamental na prevenção de danos secundários que podem
65 levar até a morte neuronal, aperfeiçoando a função de recuperação de lesões nas
66 células neuronais (SCHIVEATO-DE-SOUZA et al., 2013). Também foi comprovado o

papel importante da melatonina contra os efeitos destruidores das inflamações por diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, dessa forma protegendo os neurônios e evitando transtornos neurológicos (FANG et al., 2007). Assim, testou-se a hipótese de que a melatonina exógena possa ajudar a eliminar as complicações no cérebro ocasionadas pelo diabetes mellitus.

2. Revisão de Literatura

2.1 Diabetes Mellitus

O diabetes Mellitus (DM) é um complexo de distúrbios metabólicos caracterizados por um estado de hiperglicemia resultante da destruição de células beta do pâncreas, e por falhas na ação da insulina ou distúrbios em sua secreção (TAVARES et al., 2011 ; GOMES et al., 2016). O diabetes está relacionado com danos causados ao organismo a longo prazo, e disfunção em diversos órgãos, como olhos, rins, nervos, coração e vasos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Considera-se que esta doença vem avançando para se tornar uma epidemia global do século 21, no qual, em 2013 foi observado que na população mundial, 382 milhões de pessoas com idades entre 20 e 79 anos, foram afetadas com esta doença, e acredita-se que esse número pode chegar a 592 milhões até o ano de 2035, o que reflete em um aumento de 55% no número de casos (BALDONI et al., 2016).

O DM pode ter um impacto significativo na qualidade de vida de seus portadores, não apenas pelos seus efeitos, mas nas complicações causadas na saúde do indivíduo, fazendo com que seja necessárias medidas para controlar a doença, como dietas específicas e a automonitoração (CASTRO et al., 2008). O aumento da prevalência da obesidade, estilo de vida sedentário, o aumento e envelhecimento da população, são alguns fatores que poderiam explicar o aumento da predominância do DM na população mundial (BALDONI et al., 2016).

Em todo o mundo esta doença representa um elevado impacto econômico. Nos Estados Unidos, por exemplo, os custos com a doença chegaram a aproximadamente 132 bilhões de dólares no ano de 2002 (LIRA et al., 2006), aumentando ainda mais no ano de 2007, no qual foram registrados gastos de aproximadamente 174 bilhões de dólares. Assim, estima-se que até o ano de 2020, este custo possa chegar a 192 bilhões. Atualmente no Brasil, 2,2% do orçamento do ministério da saúde representa as despesas do DM no país, e acredita-se que esse número possa se expandir com o aumento do número de portadores (BAVARESCO et al., 2016).

Estudos americanos mostraram que menos de 50% dos indivíduos portadores do diabetes mantêm um controle da doença, o que significa que apesar da inclusão

de novos tratamentos e de um melhor entendimento sobre o impacto do DM nos últimos anos, o controle dessa doença ainda é considerado insuficiente em grande parte da população (KORO et al., 2004).

Diversos processos patogênicos estão ligados ao desenvolvimento do DM, como a destruição autoimune das células beta do pâncreas que resultará na deficiência de insulina, até anormalidades na ação da insulina que ocasionará uma resistência da mesma. A base para estas anormalidades no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, é a deficiência da ação da insulina nos tecidos alvo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). Produzida pelo pâncreas, a insulina é um hormônio que proporciona a entrada da glicose para dentro das células musculares, sendo esta glicose transformada em energia necessária para o funcionamento dos tecidos e músculos. Quando não absorvida adequadamente, a glicose permanece na corrente sanguínea caracterizando um estado de hiperglicemia, na qual afetará diversos tecidos gerando diferentes complicações (IDF, 2013).

O estresse oxidativo tem sido apontado nas principais complicações da diabetes mellitus (DAVE; KALIA, 2007), uma vez que, a hiperglicemia induz a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e também a uma diminuição das defesas antioxidantes (DALLAQUA; DAMASCENO, 2011). Estas espécies reativas podem apresentar a função de moduladoras da função celular, sinalização celular, além de respostas imunitárias sob determinadas condições fisiológicas (GÜPINAR et al., 2012).

De acordo com sua origem, o diabetes mellitus pode ser classificado em: DM tipo 1, DM tipo 2, DM gestacional e outros tipos específicos de DM com causas diferentes, como defeitos genéticos na função das células β do pâncreas e na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino (fibrose cística) e pela indução de drogas ou químicos, como por exemplo no tratamento de HIV/AIDS ou após transplante de órgãos (BAVARESCO et al., 2016).

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) atinge entre 5 a 10% das pessoas diagnosticadas com a doença. Em algumas pessoas o sistema imunológico atua erroneamente atacando as células beta do pâncreas fazendo com que pouca ou nenhuma insulina seja liberada para o corpo, e como consequência, a glicose fica na corrente sanguínea e não é utilizada como energia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Na maioria dos casos, a DM1 ocorre de maneira inesperada,

sendo relacionada com sintomas como xerostomia (boca seca), cansaço, sensação de fome constante, polidipsia (sede excessiva), micção frequente, perda de peso, surgimento de feridas com cicatrização demorada, infecções frequentes, visão turva e hiperglicemia (OND, 2014). Conhecida também como diabetes juvenil, este tipo de DM na maioria das vezes se manifesta antes dos 20 anos de idade, dependendo de fatores genéticos ou ambientais. Apesar da grande ocorrência desse tipo em crianças e adolescentes, a DM1 pode apresentar diferentes sintomas em outras faixas etárias maiores. Nesta categoria, o uso da insulina diariamente é indispensável, sendo esta necessária para o controle dos níveis de glicose no sangue (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) atinge aproximadamente 90% dos pacientes, sendo caracterizada pelo fato do organismo não conseguir usar de forma adequada a insulina que produz, ou por não produzi-la em quantidade suficiente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). A resistência à insulina é estabelecida com uma redução a ação desse hormônio nos tecidos alvo. Durante o período noturno, ocorre uma diminuição na absorção de glicose no músculo e no tecido adiposo, levando a um estado de hiperglicemia e consequentemente ao aumento nos níveis de insulina. Essa condição resulta em complicações micro e macrovasculares, incluindo retinopatia, nefropatia, neuropatia, aterosclerose e doença cardíaca (ZEPHY ; AHAMAD, 2014). Diversos fatores não modificáveis podem contribuir para o desenvolvimento desta categoria de DM, como por exemplo, idade e o histórico familiar. Entretanto, fatores como obesidade, sedentarismo e tabagismo, podem ser reversíveis caso ocorra uma intervenção prévia, diminuindo o impacto do DM2 (LYRA et al., 2006).

O DM gestacional é identificado quando a paciente apresenta a primeira intolerância à glicose durante a gravidez. (BELLAMY et al, 2009). Essa categoria origina-se do bloqueio da ação da insulina normalmente gerada por hormônios produzidos na placenta. Quando não controlada, o DM gestacional pode acarretar em complicações para mãe e para o bebê, como por exemplo, traumatismo de parto (OND, 2014). Após a gestação, a homeostasia da glicose é restaurada, entretanto as mulheres diagnosticadas com o DM continuam apresentando risco de desenvolver DM2, sendo necessária a avaliação dos níveis de glicose após seis semanas do fim da gestação (BELLAMY et al, 2009).

Diante da origem das complicações crônicas do DM, a questão mais importante que vem desafiando pesquisadores e profissionais de saúde é o controle da glicemia (ARAUJO et al., 2010). Diversos tratamentos para o DM têm sido sugeridos. Entre os tratamentos farmacológicos, a insulina e o hipoglicemiante oral (Metformina e Sulfoniluréia) são os principais recomendados pelo Ministério da Saúde Brasileiro (BAVARESCO et al., 2016). Estudos mostraram que tanto a administração de metformina como a mudança dos hábitos nos indivíduos (por exemplo dietas e exercícios físicos) reduziram a ocorrência do DM2 (SANTOMAURO-JUNIOR et al., 2008).

2.2 Cérebro e complicações cerebrais do diabetes mellitus

O cérebro adulto contém aproximadamente 10 trilhões de neurônios, e pelo menos, o dobro de células da glia, como a micróglia, astrócitos, e oligodendrócitos que tem função de suporte e proteção. Os oligodendrócitos produzem e mantem a bainha de mielina, na qual esta fornece isolamento aos axônios. Os astrócitos fornecem aos neurônios o suporte necessário para auxiliar no metabolismo e proteção, enquanto que a micróglia, que é constituída por macrófagos, atua na defesa imune do cérebro (BARBOSA et al., 2006).

Os neurônios são constituídos por um corpo celular, dendritos que são pequenas ramificações deste corpo celular, e pelo axônio que apresenta um alongamento e terminais nervosos formando uma parte da sinapse. A sinapse é definida como comunicação entre neurônios, mediada por neurotransmissores, como por exemplo dopamina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina, glicina e o glutamato, sendo este o principal neurotransmissor em mamíferos, responsável por um terço de todas as sinapses realizadas no sistema nervoso central (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2002).

O cérebro contém a segunda maior quantidade de lipídeos do corpo com 36-60% de lipídeos, ficando atrás apenas do tecido adiposo. Os lipídeos no cérebro são considerados complexos, e esse grupo inclui glicerofosfolípidos, esfingolípidos, gangliósídeos e colesterol (SINCLAIR et al., 2007). Este órgão é considerado diferenciado pois apresenta uma taxa metabólica elevada. Isso se deve ao fato deste órgão consumir aproximadamente 20% do oxigênio inspirado durante o repouso. Essa

alta necessidade metabólica se deve por que os neurônios precisam de quantidades significativas de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção de gradientes iônicos através da membrana das células e para neurotransmissão. (SHULMAN et al., 2004).

O Diabetes Mellitus provoca diversas alterações funcionais e estruturais no sistema nervoso. Essas alterações têm aumentado o interesse por estudos que sejam capazes de elucidar os efeitos dessa patologia no cérebro devido a sua relação com déficits cognitivos, assim como mudanças estruturais na substância branca e cinzenta (CERMENATI et al., 2017).

Ainda não sabe os mecanismos exatos pelos quais o diabetes mellitus afeta o cérebro, acredita-se que alterações na vasculatura cerebral, distúrbios da sinalização da insulina cerebral, resistência à insulina, a toxicidade da glicose, o estresse oxidativo, a acumulação de produtos resultantes da glicação avançada, momentos de hipoglicemia e alterações no metabolismo amiloide, são fatores que podem estar envolvidos (BORNSTEIN et al., 2014).

A produção intracelular de espécies reativas é muito elevada em diversas doenças neurodegenerativas, juntamente com a inflamação e disfunção mitocondrial (SAYRE et al., 2008 ; JOMOVA et al., 2010). A vulnerabilidade do cérebro em relação ao estresse oxidativo é resultado do seu alto consumo de oxigênio, pela numerosa quantidade de cadeias lipídicas insaturadas, abundância de íons metálicos e uma relativa falta de antioxidantes em associação a outros órgãos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Isso faz com que o cérebro seja considerado o tecido mais vulnerável ao dano oxidativo causado por radicais livres (HAIDER et al., 2014).

Portadores de diabetes mellitus, em particular aqueles que apresentam controle glicêmico falho, constantemente experimentam complicações cerebrais (VAN-HARTEN et al., 2006 ; HUANG et al., 2012). Sabe-se que o DM de longa data aumenta as chances de atrofia cerebral, infartos lacunares e lesões na substância branca. Entre as complicações cerebrais diabéticas funcionais e comportamentais se podem incluir a disfunção cognitiva e distúrbios do movimento (SHAN et al., 1998; VAN-HARTEN et al., 2006; VAN-ELDEREN et al., 2010).

Modelos experimentais de diabetes induzidos pela injeção de estreptozotocina em ratos também afetaram a função mitocondrial no córtex cerebral. Além disso, outros estudos mostraram haver uma ligação entre o diabetes e alterações na homeostase do colesterol não apenas no sistema nervoso central, como também no

córtex cerebral (CERMENATI et al., 2012; ROMANOA et al., 2017; CERMENATI et al., 2017).

Uma das principais complicações cerebrais ocasionadas pelo DM esta a neuropatia diabética, que foi reconhecida pela primeira vez por Marchal de Calvi em 1864 (NASCIMENTO et al., 2016). A neuropatia diabética (ND) pode ser definida como um dano neurológico em pacientes que apresentam o diabetes mellitus (DM), na qual esta desordem pode ser demonstrada de forma clinica ou subcl clinicamente, decorrente do aparecimento do diabetes mellitus sem outros fatores para neuropatia. Esta complicação afeta neurônios sensoriais periféricos, sendo comum tanto no tipo 1 como no tipo 2 (FENG et al., 2016). As manifestações no sistema nervoso somático e autônomo incluem-se nas modificações neuropáticas do diabetes (SCHIMID, 2007).

A ND inclui um grupo de alterações que estão relacionadas com o envolvimento estrutural e funcional das fibras nervosas sensitivas, motoras e autonômicas, na qual estas podem sofrer alterações reversíveis ou inalteráveis, clinicamente se manifestando de formas variáveis desde síndromes dolorosas graves até formas assintomáticas (TSCHIEDEL, 2014).

Diversos fatores contribuem para que o desenvolvimento da neuropatia diabética, como: hipóxia endoneural, isquemia, e aumento do estresse oxidativo (SOLMAZ et al., 2017). Entretanto a causa exata para desencadear a neuropatia diabética é desconhecida. Sabe-se que esta patologia é resultado de diversas alterações químicas de diferentes origens, porém se acredita que a hiperglicemia crônica seja a maior responsável para o desenvolvimento de mudanças realizadas pelo metabolismo (SETH; TATA, 2012 ; TESHAYE; SELVARAJAH 2012).

Para estabilização e melhora das complicações cerebrais, assim como para a neuropatia diabética é necessário um controle glicêmico rigoroso, para que seja possível manter o paciente em um estado de normoglicemia (TESFAYE et al., 2010). Diversas evidências indicam que o estresse oxidativo está envolvido nas complicações causadas pelo diabetes no cérebro, fazendo com que fármacos antioxidantes sejam uma excelente alternativa de tratamento (NASCIMENTO et al., 2016).

2.3 Melatonina

A melatonina ou N-acetil-5-metoxitriptamina, é o principal hormônio produzido pela glândula pineal (PYTKA et al., 2017). Sintetizado a partir do aminoácido essencial triptofano, esse hormônio tem sua produção regulada pelo núcleo supraquiasmático (SCN) localizado no hipotálamo, sob a influência do período noturno. A melatonina possui um papel importante na regulação do ritmo circadiano e do sono, apresentando também função na regulação de partes do sistema imunológico, na expressão gênica, na regulação da temperatura corporal, além de propriedades antioxidantes (SCHOLTENS et al., 2016). A produção deste hormônio pode ocorrer também em diversos tecidos como retina, corpo ciliar da íris, glândulas harderianas e lacrimais, linfócitos, e intestino grosso (MAGANHIN et al., 2008).

A secreção da melatonina é acarretada pela liberação de noradrenalina (NE) por fibras nervosas intraparenquimatosas, no qual essa liberação e a atividade da glândula pineal são ativadas em ambiente escuro e inibidas pela luz (MAGANHIN et al., 2009). A biossíntese deste hormônio começa pela estimulação de receptores adrenérgicos B-1 pela ativação noradrenérgica na glândula pineal. Este processo é iniciado a partir da retina, um órgão sensível a luz, que envia mensagem através dos núcleos supraquiasmáticos e paraventricular do hipotálamo para o gânglio cervical superior e em seguida para a glândula pineal (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

A melatonina possui duas vias principais de metabolização que ocorrem no fígado e no cérebro. No fígado a hidroxilação da melatonina ocorre formando 6-hidroximelatonina, acompanhada de uma conjugação com sulfato de glucoronato sendo em seguida liberada na urina sob a forma de 6-sulfatoximelatonina. Todavia no cérebro, a melatonina é convertida em N-acetil-2-formilmetoxiquinurenemia que sofre degradação imediata para N-acetil-5-metoxiurenemia (MAGANHIN et al., 2009; MACCHI; BRUCE, 2004; CLAUSTRAT et al., 2005).

Acredita-se que a melatonina desempenha um importante papel durante o ciclo de vida, atuando no processo de crescimento, desenvolvimento, amadurecimento e envelhecimento. Isso se deve ao fato de que a produção da melatonina apresenta uma variação ao longo do desenvolvimento ontogenético. De acordo com a espécie, este hormônio é produzido em maior quantidade e tem papel mais significativo no controle das funções circadianas, por exemplo na espécie humana, em que a

melatonina tem sua maior concentração durante infância, uma diminuição desta concentração antes da puberdade, e uma nova diminuição acentuada durante a fase de senectude (LANGER et al., 1997).

A procura por outras funções fisiológicas para a melatonina tem sido estimulada pela identificação de receptores para esse hormônio em uma variedade de tecidos (CAMPINO et al., 2008). Esta por sua vez, atua através de receptores específicos denominados MT1, MT2 e MT3, no qual ainda não se sabe se este terceiro receptor existe, ou se trataria de uma enzima denominada redutase quinona 2. Acredita-se também na existência de receptores nucleares em que seja possível a melatonina interagir modificando a atividade de enzimas do citoplasma (MAGANHIN et al., 2008). Acoplados a proteína G, a ativação dos receptores de melatonina é frequentemente relacionada não apenas ao ciclo claro e escuro, mas também a respostas imune, vasodilatação ou vasoconstrição, assim como a proliferação celular (DUBOCOVICH; MARKOWSKA 2005).

Vários estudos relataram os efeitos da melatonina em diversos casos de doenças em nível clínico, entretanto, ainda não se sabe de forma exata o seu mecanismo de ação, aumentando os estudos sobre esse mecanismo. Considera-se que um dos mecanismos da melatonina poderia ser sua ação na membrana (AKKAS et al., 2007), por ser um composto parcialmente lipofílico, a melatonina consegue passar pelas membranas celulares facilmente e penetrar rapidamente na barreira hemato-encefálica e na placenta (GEORGE; BUBENIK, 2002).

Na apoptose, processo definido pela morte programada das células, a melatonina apresenta ação na via extrínseca modulando os receptores de morte, assim como também na via intrínseca quando elimina radicais oxidantes do citoplasma que podem ser originados pela mitocôndria. A melatonina pode interagir com receptores nucleares exercendo ação genômica direta, modificando a expressão dos genes do apoptose, e dessa maneira inibindo a morte celular (FERREIRA et al., 2010).

2.4 Melatonina e Diabetes

A melatonina possui funções importantes na regulação do metabolismo energético, e em respostas imunológicas e inflamatórias. Pesquisas com indivíduos

portadores de diabetes mellitus, que apresentaram níveis reduzidos de melatonina, foram observados uma contribuição para uma piora acentuada em parâmetros do sono e do controle glicêmico, um possível progresso na resistência à insulina e à leptina, além de um crescimento na oxidação de tecidos, na qual irá originar diversas complicações crônicas (RADZIUK; PYE, 2006; JAUCH-CHARA et al., 2008; ESTRADA et al., 2011).

O estresse oxidativo é considerado um mecanismo patogênético para as complicações do diabetes mellitus, no qual este é resultante de um estado prolongado de hiperglicemia (JOHAR; BERNSTEIN, 2017). Nos portadores de DM, o estresse oxidativo é induzido pela presença de espécies reativas de oxigênio, acarretando em danos aos tecidos que irá originar complicações como neuropatia, retinopatia, nefropatia, e doença isquêmica do coração (MARRAZO et al., 2014). Essas complicações se tornaram um desafio, fazendo com que sejam desenvolvidas pesquisas para encontrar formas de diminuir o estresse oxidativo, e consequentemente as complicações do diabetes mellitus. Estudos mostraram que os antioxidantes podem desempenhar um papel significativo na melhoria do DM (SEKKIN et al., 2015).

Diversos estudos apontaram a capacidade antioxidante da melatonina, e indicaram que este hormônio também é capaz de atuar junto com as vitaminas C e E. O papel de antioxidante é atribuído a esse hormônio por ele ser capaz de doar elétrons em processos não enzimáticos (MAGANHIN et al., 2008), e estimular enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, a glutianona peroxidase e glutianona dismutase (REITER et al., 2000; SOUZA et al., 2016).

A diminuição do nível de melatonina de modo irregular tem sido relacionada com o diabetes mellitus (PESCHKE et al., 2006), sugerindo que este hormônio seja um sinal crítico para o regulamento da glicose no sangue e na homeostase (CLAUSTRAT et al., 2005). A redução nos níveis de melatonina e uma correlação entre a melatonina e a insulina foram observadas em pacientes diabéticos, sugerindo que a melatonina pode ser afetada por processos que originam o diabetes (PESCHKE et al., 2006). Outros estudos mostraram que em humanos, a administração de melatonina reduziu a tolerância a glicose, especialmente no período da manhã onde houve uma diminuição da liberação de insulina, enquanto que durante a noite houve um declínio na sensibilidade a este hormônio (RUBIO-SASTRE et al., 2014).

Com isso, cada vez mais têm sido estudado os efeitos da melatonina exógena no controle do diabetes mellitus, apresentando resultados significativos (WINIARSKA et al., 2005), como a melhora da glicemia pré e pós-pandrial, da hemoglobina glicada, além de um desenvolvimento da resposta tecidual a um hipoglicemiante oral, como a metformina (HUSSAIN et al., 2006; KADHIM et al., 2006).

2.5 Melatonina no cérebro

Sabe-se que pelo menos 110 estruturas cerebrais apresentam receptores de melatonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003), como em áreas do núcleo supraquiasmático, vários núcleos hipotalâmicos e talâmicos, hipocampo, neurônios dopaminérgicos, córtex cerebelar, córtex pré-frontal, gânglios de base e substância cinzenta (PANDI-PERUMAL, 2008; ZALWISKA, 2009).

O sistema nervoso é um dos sistemas mais complexos, no qual, qualquer doença ou ataque traumático pode levar a sua degeneração, incluindo a perda da homeostase (SAMANTARAY et al., 2010). Estudos mostraram que a melatonina possui propriedade de neuroproteção contra várias patologias neurológicas por diminuir o estresse oxidativo cerebral, onde espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante na patogênese de diversas doenças, incluindo doenças que afetam o sistema nervoso central. A geração excessiva de ROS levam a inflamação e apoptose celular (PASCHEN, 2000; MAGHOLL et al., 2013) .

Observou-se que a melatonina pode exercer função antiapoptótica por ela inibir a atividade de vias intrínsecas da apoptose e ativação de vias de sinalização que podem originar doenças cerebrais como o acidente vascular cerebral (AVC), a doença de Alzheimer, doença de Parkinson (PD) e esclerose lateral amiotrófica (WANG, 2009). Nos efeitos neuroprotetores deste hormônio também podem ser consideradas as interações específicas da sua indução com seus receptores. Os receptores de melatonina ativados no cérebro participam na regulação dos níveis de fatores neurotróficos, que apresentam um papel significativo na manutenção das células neuronais, além de ser amplamente distribuídos no sistema nervoso central (KABADI; MAHER, 2010).

Vários trabalhos tem mostrado que a melatonina pode ser um significativo modulador de funções do sistema nervoso central, no qual El-Sherif et al. (2003)

mostrou que os neurônios expostos à melatonina mudaram sua excitabilidade em resposta a estimulações constantes, considerando esse hormônio como uma molécula endógena com níveis de oscilação capazes de modular fenômenos de plasticidade neural ligados a processos de aprendizado e memória.

A melatonina apresenta implicações fisiológicas em diferentes tipos de cefaleias através de seus efeitos anti-inflamatórios e anti-radicaís livres, de sua regulação neurovascular (PERES, 2005), como também modula a pressão sanguínea e protege o sistema vascular (PAULIS; SMIKO, 2007), além de possuir efeitos anti-carcinogênicos (STEVENS, 2007).

2.6 Citocinas inflamatórias e diabetes

O diabetes mellitus (DM) é uma patologia inflamatória crônica (PRADHAN-NABZDYK et al., 2013), na qual essa inflamação induz a um aumento nos níveis séricos dos marcadores de inflamação alterando a síntese e liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos, resultando na remodelação e disfunção neuronal nociceptiva (CHANDRASEKHARAN et al., 2013; KISPELYI et al., 2014). Estas mudanças adaptativas ocasionam em uma perda neuronal e modificações na estrutura do sistema nervoso que leva a dor neuropática (NONES et al., 2013; BARABAS et al., 2014).

Evidências substanciais indicam um mecanismo imunopático no desenvolvimento de complicações cerebrais, assim como da neuropatia diabética. Foi provado a presença de agentes pró-inflamatórios em portadores de DM que apresentavam a complicações cerebrais, ocasionando no recrutamento de células inflamatórias, a produção de citocinas e diminuição no fluxo sanguíneo (GRUDEN et al., 2008). Estes mecanismos aumentam a hipóxia e isquemia no nervo periférico, o que impossibilita a sua regeneração (McDONALD et al., 2007). As citocinas são um grupo de proteínas que apresentam um peso molecular baixo, atuando na intercomunicação celular. Estas são liberadas pelo aparecimento de diferentes estímulos, e interagem com seus receptores controlando a função celular (VITALLE; RIBEIRO, 2007).

As citocinas pró-inflamatórias são produzidas em maior quantidade pelos macrófagos ativados e participam da regulação de reações inflamatórias. Pacientes

portadores de diabetes apresentam níveis maiores de concentração plasmática de citocinas proinflamatórias como IL-6 e TNF- α , onde estes podem potencializar quadros de inflamação (SAMUEL et al., 2012).

2.6.1 Interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α)

A IL-6 é uma citocina sintetizada por monócitos, células endoteliais, fibroblastos e outras células em resposta a microorganismos e estimulação de outras citocinas como o TNF- α atuando na resposta imune inata e adaptativa (SOUZA et al, 2007). Esta citocina pleitrófica está envolvida em uma grande quantidade de diferentes funções dentro do corpo, como a modulação da proliferação e diferenciação, maturação de células progenitoras (LEE, 1992), controle das atividades metabólicas celulares (GAULDI et al., 1987), cascata do sistema imunológico e modulação do sistema nervoso. O aumento no número de evidências mostram o papel da IL-6 no desenvolvimento neuronal, diferenciação (MARZ et al., 1997; NAKAFUKU, 1992), sobrevivência (HAMA et al., 1991) e regeneração e degeneração nos sistemas nervoso periférico e central (ARRUDA et al., 2000). A hiperglicemia, uma característica da intolerância à glicose, é associada com a síntese imediata de marcadores como o IL-6, variando os níveis séricos positivamente relacionados e com relevantes acréscimos na hiperglicemia em pulsos, sendo esta uma situação comum em diabéticos (SOUZA et al., 2007).

O fator de necrose tumoral (TNF- α) pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos e monócitos (BINGHAM, 2002), e tem a presença de lipopolissacarídeos como estímulo para sua produção (VITALLE; RIBEIRO, 2007). Após sua produção e liberação, o TNF- α irá se ligar a receptores específicos chamados de TNF- R I e II, para que possa realizar seu efeito biológico. Além disso, estes receptores podem estimular o início do processo de apoptose (ABBAS et al., 1998).

Desta forma, acredita-se que o efeito fisiológico mais importante deste fator é promover uma resposta imune e inflamatória por meio de uma junção de neutrófilos e monócitos, ativando-os e levando para o lugar da infecção, e consequentemente provocando uma série de efeitos no organismo (VITALLE; RIBEIRO, 2007).

2.7 Insulina no cérebro

Em resposta aos elevados níveis de glicose, as células β do pâncreas secretam a insulina, um hormônio anabólico, essencial para a manutenção da homeostase da glicose e também para o crescimento e diferenciação celular. A regulação da homeostase por esse hormônio ocorre em diversos níveis, reduzindo a produção hepática da glicose, sendo esta captada em maior proporção nos tecidos muscular e adiposo (CARVALHEIRA et al., 2002). Apesar da glicose ser o principal determinante fisiológico para estimular a secreção de insulina, agentes farmacológicos como as sulfonilureias também demonstraram exercer efeitos estimulantes (JOSHI et al., 2007).

A ação da insulina na célula se inicia através da sua ligação ao receptor presente na membrana plasmática, e assim a absorção da glicose por células é feita através do transportador de glicose conhecido como GLUT 2 (JOSHI et al., 2007). Em quase todos os tecidos dos mamíferos é possível encontrar o receptor deste hormônio, entretanto sua concentração apresenta uma variação, desde 40 receptores nos eritrócitos até mais de 200.000 em células adiposas e hepáticas (HABER et al., 2001).

Os primeiros estudos realizados para elucidar os efeitos da insulina no sistema nervoso central foram conduzidos, sendo estes predominantemente associados ao metabolismo da glicose. Até meados da década de 50, acreditava-se que este hormônio não apresentava efeitos sobre utilização e absorção da glicose pelo cérebro. Entretanto, ao final desta mesma década, estudos iniciais realizados *in vitro* demonstraram que a insulina aumenta a absorção da glicose pelo tecido nervoso (CHOWERS et al., 1961; GHASEMI et al., 2013).

Ainda não se sabe ao certo a origem da insulina a nível cerebral. Atualmente são descritas diversas hipóteses: a sua produção no sistema nervoso central ocorre pela existência do peptídeo C, do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) de pré-pro-insulina; uma origem periférica no qual é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica por um sistema de transporte saturável; ou a associação de ambas hipóteses (BRAZ, 2015)

Com o tempo, foi observado que a insulina desempenha diversas funções no sistema nervoso central (SNC), no qual são encontrados receptores deste hormônio

529 por todo o cérebro (BANCOS, 2004). Estudos mostraram que locais como o bulbo
530 olfativo, córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e plexo coróide apresentam uma maior
531 presença desses receptores (GHASEMI et al., 2013).

532 A descoberta destes receptores levou a estudos que reconheceram a
533 importância da sinalização da insulina em processos importantes como a
534 sobrevivência neuronal e a plasticidade sináptica (BANKS et al., 2012). Além disso,
535 estão descritas diversas funções para a insulina a nível de metabolismo energético,
536 ingestão alimentar, controle de peso, processos cognitivos como aprendizagem e
537 memória, modelando a concentração de neurotransmissores como acetilcolina e
538 noradrenalina e também em processos de neuromodulação e neuroproteção (REGER
539 et al., 2006 ; GASHEMI et al., 2013).

540 A ação da insulina no crescimento e desenvolvimento celular mediados por
541 seus receptores tem sido mencionados não só em neurônios como em células da glia.
542 Em pesquisas realizadas em roedores (VELAZQUEZ et al., 2009) e também em
543 células humanas (HENI et al., 2011), foi demonstrado que a insulina estimula a
544 proliferação de astrócitos, sendo estas células modeladoras de funções neuronais,
545 podendo assim contribuir para ações centrais da insulina, incluindo o crescimento
546 celular (BLAZQUEZ et al., 2014).

547 Este hormônio tem sua função neuroprotetora bem documentada, sendo capaz
548 de inibir a apoptose e proporcionar proteção ao cérebro em situações de estresse
549 oxidativo, isquemia e toxicidade do peptídeo β -amilóide (GHASEMI et al., 2013; BRAZ
550 2015). Também foi demonstrado que baixo nível de insulina durante longos períodos,
551 como ocorre em casos de diabetes mellitus tipo 1, induzem a apoptose de células da
552 região do hipocampo, podendo assim acarretar em uma perda neuronal e disfunção
553 cognitiva (LI et al., 2002).

554 Distúrbios na secreção de insulina pode ser um fator determinante para o
555 desenvolvimento de patologias. A disfunção na sinalização deste hormônio acarreta
556 em uma diminuição na sua capacidade neuroprotetora, com um acúmulo de β -
557 amilóide, e deterioração sináptica, o que pode aumentar as chances do surgimento
558 de patologias, como a doença de Alzheimer (GHASEMI et al., 2013; BLÁZQUEZ et al.
559 2014; BRAZ, 2015).

3. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. **Imunol. Cel. Mol.** v. 2, p. 253-276, 1998.
- AKKAS, S. B.; INCI, S.; ZORLU, F. et al. Melatonin affects the order, dynamics, and hydration of brain membrane lipids. **J. Mol. Struc.** v. 836, p. 207-215, 2007.
- ALEXANDRAKI, K.; PIPERI, C.; KALOFOUTIS, C. et al. The inflammatory process in type 2 diabetes. The role of cytokines. **Ann. N. Y. Acad. Science.** v. 1084, p. 89-117, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 37, n. 1, p.14-80, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care.** v. 38, n. 1, 2015.
- ARAÚJO, M. F. M.; GONÇALVES, T. C.; DAMASCENO, M. et al. Aderência de diabéticos ao tratamento medicamentoso com hipoglicemiantes orais. **Esc. Anna Nery.** v. 14, n. 2, p. 361-367, 2010.
- ARRUDA, J. L.; SWEITZER, S.; RUTKOWSKI, M.D. et al. Intrathecal anti-IL-6 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. **Brain Res.** v. 879, p. 216-225, 2000.
- BALDONI, N. R.; AQUINO, J. A.; SANCHES-GIRAUD, C. et al. Collective empowerment strategies for patients with diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Prim. Care Diabetes.** v. 11, p. 201-211, 2017.
- BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. Insulin on the brain: there and back again. **Pharmacol. Ther.** v. 136, n. 1, p. 82-93, 2012.
- BARABAS, M. E.; MATTSON, E. C.; ABOUALIZADEH, E. et al. Chemical structure and morphology of dorsal root ganglion neurons from naive and inflamed mice. **J. Biol Chem.** v. 289, n. 49, p. 241-249, 2014.

589 BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e
 590 neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quim.**
 591 **Nova.** v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006.

592 BAVARESCO, D. V.; FERREIRA, N. C.; CERETTA, L. B. et al. Prejuízos cognitivos
 593 em diabetes mellitus: revisão de literatura. **Rev. Inova Saúde.** v. 5, n. 1, p. 30-41,
 594 2016.

595 BELLAMY, L.; CASAS, J. P.; HINGORANI, A. D. et al. Type 2 diabetes mellitus after
 596 gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. **The lancet.** v. 373, p.
 597 1773-1779, 2009.

598 BIESSELS, G. J.; VAN-DER-HEIDE, L. P.; KAMAL, A. et al. Ageing and diabetes:
 599 implications for brain function. **Eur. J. Pharmacol.** v. 441, n. 1-2, p. 1-14, 2002.

600 BINGHAN, C. O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved
 601 in bone degradation and inflammation. **J. Rheumatol. Suppl.** v. 29, n. 65, p. 3-9, 2002.

602 BLÁZQUEZ, E.; VELÁZQUEZ, E.; HURTADO-CARNEIRO V. et al. Insulin in the brain:
 603 its pathophysiological implications for states related with central insulin resistance, type
 604 2 diabetes and alzheimer's disease. **Front. Endocrinol.** v. 9, n. 5, p. 161, 2011.

605 BORNSTEIN, N. M.; BRAININ, M.; GUEKHT, A. et al. Diabetes and brain: issues and
 606 needs not met. **Neurol. Sci.** v. 35, n. 7, p. 995-1001, 2014.

607 BRAZ, N. I. A insulina e o cérebro: da função a disfunção. **Fac. Med. da Uni.** Coimbra.
 608 2015.

609 CAMPINO, C.; VALENZUELA, F.; ARTEAGA, E. et al. La melatonina reduce la
 610 respuesta de cortisol al ACTH en humanos. **Rev. Med. Chile,** v. 136, n. 11, p. 1390-
 611 1397, 2008.

612 CARDOSO, J. F.; GOMES, K. B.; FERNANDES, A. P. et al. Evaluation of cytokines
 613 in type 1 diabetes patients with and without retinopathy. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.
 614 53, n. 1, p. 31-37, 2017.

615 CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da
 616 insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46, n. 4, p. 419-425, 2002.

617 CASTRO, C. L. N.; BRAULIO, V. B.; DANTAS, F. A. L. et al. Qualidade de vida em
618 diabetes mellitus e classificação internacional de funcionalidade, incapacidade e
619 saúde – estudo de alguns aspectos. **Acta. Fisiatr.** v. 15, n. 1, p. 13-17, 2008.

620 CERMENATI, G.; ABBIATI, F.; CERMENATI, S. et al. Diabetes-induced myelin
621 abnormalities are associated with an altered lipid pattern: protective effects of LXR
622 activation. **J.Lipid Res.** v. 53, n. 2, p. 300-310, 2012.

623 CERMENATI, G.; GIATTI, S.; AUDANO, M. et al. Diabetes alters myelin lipid profile in
624 rat cerebral cortex: protective effects of dihydroprogesterone. **J. Steroid**
625 **Biochem. Mol. Biol.** v. 168, p. 60-70, 2017.

626 CHANDRASEKHARAN, B; NEZAMI, B. G.; SRINIVASAN, S. Emerging neuropeptide
627 targets in inflammation: NPY and VIP. **Am. J. Physiol.** Gastrointest. Liver Physiol. v.
628 304, p. 949-957, 2013.

629 CHOWERS, I.; LAVY, S.; HALPERN, L. Effect of insulin administered intracisternally
630 in dogs on the glucose level of the blood and the cerebrospinal fluid. **Exp. Neurol.** v.
631 3, n. 2, p. 197-205, 1961.

632 CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology
633 of melatonin. **Sleep Med. Rev.** v. 9, n. 1, p. 11-24, 2005.

634 CORREA, K.; GOUVEA, G. R.; SILVA, M. A. V. et al. Qualidade de vida e
635 características dos pacientes diabéticos. **Ciênc. saúde coletiva.** v. 22, n. 3, p. 921-
636 930, 2017.

637 CUI, X.; ZUO, P.; ZHANG, G. et al. Chronic systemic D-galactose exposure induces
638 memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: protective effects of
639 R-alpha-lipoic acid. **J. Neurosci. Res.** v. 84, n. 3, p. 647-654, 2006.

640 DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas
641 medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de
642 atualização. **Rev. Bras. Plantas Med.** v. 13, n. 3, p. 366-373, 2011.

643 DAVE G. S.; KALIA K. Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2
644 diabetic patients with and without nephropathy. **Cell. Mol. Biol.** (Noisy-le-Grand,
645 France) v. 30, n. 5, p. 68-78, 2007.

646 DUBOCOVICH, M. L.; MARKOWSKA, M. Functional MT1 and MT2 melatonin
647 receptors in mammals. **Endocrine**. v. 27, p. 101–110, 2005.

648 EL-SHERIF, Y.; TESORIERO, J.; HOGAN, M. V. et al. Melatonin regulates neuronal
649 plasticity in the hippocampus. **J. Neurosc. Res.** v. 72, p. 454-460, 2003.

650 ESTRADA, C. L.; DANIELSON, K. K.; DRUM, M. L. et al. Insufficient sleep in Young
651 patients with diabetes and their families. **Biol. Res. Nurs.** v. 14, n. 1, p. 48-54, 2011.

652 FANG, Q.; CHEN, W.; ZHU, W. et al. Influence of melatonin on cerebrovascular
653 proinflammatory mediators expression and oxidative stress following subarachnoid
654 hemorrhage in rabbits. **Mediators Inflamm.** v. 209, p. 1-6, 2009.

655 FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES (IDF). **Diabetes Atlas**. Disponível
656 em: www.idf.org/diabetesatlas . Acesso em: 07/02/2017.

657 FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER J. The biology of VEGF and its receptors.
658 **Nat. Med.** v.9, p. 669–676, 2003.

659 FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S. et al. Melatonina: modulador de
660 morte celular. **Rev. Ass. Med. Bras.** v. 56, n. 6, p. 715-718, 2010.

661 GAULDIE, J.; RICHARD, C.; HARNISH, D. et al. Interferon γ /B-cell stimulating factor
662 type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and
663 regulates the acute phase response in liver cells. **Proc. Natl. Aca. Sci.** v. 84, p. 7251-
664 7259, 1987.

665 GEORGE, A.; BUDENIK, M. D. Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and
666 Clinical Relevance. **Dig. Dis. Sci.** v. 47, n. 10, p. 2336-2348, 2002.

667 GHASEMI, R.; HAERI, A.; DARGAHI, L. et al. Insulin in the brain: sources, localization
668 and functions. **Mol. Neurobiol.** v. 47, p. 145-71, 2013.

669 GOMES, J. M. G.; COSTA, J. A.; AFENAS, R. C. Metabolic endotoxemia and
670 diabetes mellitus: A systematic review. **Metabolism**. v. 68, p. 133-144, 2016.

671 GRUDEN, G.; BRUNO, G.; CHATURVEDI, N. et al. Serum heat shock protein 27 and
672 diabetes complications in the EURODIAB prospective complications study: a novel
673 circulating marker for diabetic neuropathy. **Diabetes**. v. 57, n. 7, p. 1966-70, 2008.

674 GÜRPINAR, T; EKERBICER, N; UYSAL, N. et al. The Effects of the Melatonin
675 Treatment on the Oxidative Stress and Apoptosis in Diabetic Eye and Brain. **Sci.**
676 **World J**. v. 201, p. 498-489, 2012.

677 HABER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O. et al. Secreção da insulina: efeito
678 autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**
679 v. 45, n.3, p. 219-227, 2001.

680 HAIDER, S.; SALEEM, S.; PERVEEN, T. et al. Age-related learning and memory
681 deficits in rats: role of altered brain neurotransmitters, acetylcholinesterase activity and
682 changes in antioxidant defense system. **Age**. v. 36, n. 3, p. 1291-1302, 2014.

683 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. Free
684 Radic. **Biol. Med. Oxford Uni. Press**, v. 4, p.888, 2007.

685 HAMA, T.; KUSHINA, Y.; MIYAMOTO, M. et al. Interleukin-6 improves the survival of
686 mesencephalic catecholaminergic and septal cholinergic neurons from postnatal, two-
687 week-old rats in cultures. **Neuroscience**. v. 40, p. 445–452, 1991.

688 HENI, M.; HENNIGE, A. M.; PETER, A. et al. Insulin promotes Glycogen storage and
689 cell proliferation in primary human Astrocytes. **Plos One**. v. 6, n. 6, 2011.

690 HUSSAIN, S.A.; KHADIM, H. M.; KHALAF, B.H. et al. Effects of melatonina and zinc
691 on glycemic control in type diabetic patients poorly controlled with metformin. **Saudi**
692 **Med. J**. v. 27, n. 10, p. 1483-88, 2006.

693 JAUCH-CHARA, K.; SCHIMID S. M.; HALLSCHMID M. et al. Altered neuroendocrine
694 sleep architecture in patients with type 1 diabetes. **Diabetes care**. v. 31, n. 6, p. 1183-
695 8, 2008.

696 JOHAR, D. R.; BERNSTEIN, L. H. Biomarkers of stress-mediated metabolic
697 deregulation in diabetes mellitus. **Diabetes res. Clinical Pra.** v. 126, p. 222-229, 2017.

698 JOMOVA, K.; VONDRAKOVA, V.; LAWSON, M. et al. Metals, oxidative stress and
699 neurodegenerative disorders. **Mol. Cell. Biochem.** v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010.

700 JOSHI, S. R.; PARIKH, R. M.; DAS, A.K. Insulin – History, biochemistry, physiology
701 and pharmacology. **J. Ass. Physic. Índia.** v. 55, p. 19-25, 2007.

702 KABADI, S. V.; MAHER, T. J. Posttreatment with uridine and melatonin following
703 traumatic brain injury reduces edema in various brain regions in rats. **Ann. N. Y. Acad.**
704 **Sci.** v. 1199, p. 105-113, 2010.

705 KADHIM H. M.; ISMAIL, S.H.; HUSSEIN, K. L. et al. Effects of melatonina and zinc on
706 lipid profile and renal function in type 2 diabetic patients poorly controlled with
707 metformin. **J. Pineal Res.** v. 41, n. 2, p. 189-193, 2006.

708 KISPELYI, B.; LOHINAI, Z.; ALTDORFER, K. Neuropeptide analysis of oral mucosa in
709 diabetic rats. **Neuroimmunomodulation.** v. 21, p. 213-220, 2014.

710 KORO, C. E.; BOWLIN, S. J.; BOURGEOIS, N. et al. Glycemic control from 1988 to
711 2000 among us adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. **Diabetes**
712 **Care.** v. 27, n. 1, p. 17-20, 2004.

713 LANGER, M.; HARTMANN, J.; TURKOF, H. et al. Melatonin in the human an overview.
714 **Wien. Klini. Wochenschr.** v. 109, n.18, p. 707-13, 1997.

715 LEAHY, J.L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Arch. Med. Res.** v.36, p.197-
716 209, 2005.

717 LEE, F.D. The role of interleukin-6 in development. **J. Dev. Biol.** v. 151, p. 331–338,
718 1992.

719 LI, Z.G.; ZHANG, W.; GRUNBERGER, G. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1
720 diabetes. **Brain Res.** v. 946, p.221-31, 2002.

721 LYRA, R.; OLIVEIRA, M.; LINS, D. et al. Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. **Arq.**
722 **Bras. Endocrinol. Metab.** v. 50, n. 2, p. 239-249, 2006.

723 MACCHI, M. M.; BRUCE, J. N. Human pineal physiology and functional significance
724 of melatonin. **Front. Neuroendocrinol.** v. 25, n. 3, p.177-195, 2005.

725 MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H. et al. Efeitos da melatonina
726 no sistema genital feminino: breve revisão. **Rev. Ass. Med.** v.54, n.3, p .267-271,
727 2008.

728 MAGANHIN, C.C.; SIMOES, R. S.; FUCHS, L. F. P. et al. Rat pinealectomy: a
729 modified direct visual approach. **Acta Cir. Bras.** v. 24, n. 4, p. 321-324, 2009.

730 MAGHOOL, F.; KHAKSARI, M.; SIAHPOSHT, A.K. Differences in brain edema and
731 intracranial pressure following traumatic brain injury across the estrous cycle:
732 involvement of female sex steroid hormones. **Brain Res.** v. 1497, p. 61–72, 2013.

733 MARRAZO, G.; BARBAGALLO, I.; GALVANO, F. et al. Role of dietary and
734 endogenous antioxidants in diabetes. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 54, p. 1599-1616,
735 2014.

736 MARZ, P.; HERGET, E.; LANG, E. et al. Activation of gp130 by IL-6 / soluble IL-6
737 receptor induces neuronal differentiation. **Eur. J. Neurosci.** v. 12, p. 2765-2773, 1997.

738 MCDONALD, D. S.; CHENG, C.; MARTINEZ, J. A. et al. Regenerative arrest of
739 inflamed peripheral nerves: role of nitric oxide. **Neuroreport.** v. 18, n. 16, p. 1635-40,
740 2007.

741 MENDES, A. L.; MIOT, H. A.; HADDAD-JUNIOR, V. Diabetes mellitus and the skin.
742 **An. Bras. Dermatol.** v. 92, n. 1, p. 8-20, 2017.

743 MURIACH, M.; BELLVER, M. F.; ROMERO, F. J. et al. Diabetes and the brain:
744 oxidative stress, inflammation, and autophagy. **Oxid. Med. Cell. Long.** v. 14, p. 9, 2014.
745

746 NADZDYK, P.; KUCHIBHOTLA, L.; GUTHRIE, S. et al. Expression of neuropeptides
747 and cytokines in a rabbit model of diabetic neuroischemic wound healing. **J. Vasc.**
748 **Surg.** v. 58, p. 766-775, 2013.

749 NAKAFUKU, M.; SATOH, T.; KAZIRO, Y. T. Differentiation factors, including nerve
750 growth factor, fibroblast growth factor, and interleukin-6, induce an accumulation of an

751 active *ras*-GTP complex in rat pheochromocytoma PC12 cells. **J. Biol. Chem.** v. 267,
752 p. 19448–19454, 1992.

753 NASCIMENTO, O. J. M.; PUPE, C. C. B.; CAVALCANTI, E. B. Diabetic neuropathy.
754 **Rev. Dor**, v. 17, p. 46-51, 2016.

755 NASKAR, S.; VICTOR, R.; NATH, K. Depression on diabetes mellitus – a
756 comprehensive systematic review of literature from an Indian perspective. **Asian J.**
757 **Psychiatr.** v. 16, 2017.

758 NAVARRO, J. F.; MORA, C. Role of inflammation in diabetic
759 complications. **Nephrol. Dial. Transplant.** v. 20, p. 2601 –2604, 2005.

760 NAVARRO-GONZALEZ, F.J.; MORA-FERNANDEZ, C. The role of inflammatory
761 cytokines in diabetic nephropathy. **J. Am Soc. Nephrol.** v. 19, n. 3, p. 433-42, 2008.

762 NONES, C. F.; REIS, R. C.; JESUS, C. H. et al. Orofacial sensory changes after
763 streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Res.** v. 1501, p. 56-67, 2013.

764 OBSERVATÓRIO NACIONAL DE DIABETES – Sociedade Portuguesa de
765 Diabetologia. **Facto e números 2014**. Disponível em: <http://www.dgs.pt/?cr=26575>.
766 Acesso em: 09/02/2017.

767 OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Curr. Biol.** v. 22, n.
768 17, p. 733-740, 2012.

769 PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health
770 and disease. **Physiol. Rev.** v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

771 PANDI-PERUMAL, S. R.; TRAKHT, I.; SRINIVASAN, V. et al. Physiological effects of
772 melatonina: role of melatonina receptors and signal transduction pathways. **Prog**
773 **Neurobiol**, v.85, p. 335-353, 2008.

774 PASCHEN, W. Role of calcium in neuronal cell injury: which subcellular compartment
775 is involved? **Brain Res. Bull.** v.53, n. 4, p. 409–413, 2000.

776 PAULIS, L.; SMIKO, F. Blood pressure modulation and cardiovascular protection by
777 melatonina: potential mechanism behind. **Physiol. Res.** v. 56, p. 671-684, 2007.

778 PERES, M. F. P. Melatonin, the pineal gland and their implication for headache
779 disorders. **Cephalgia**. v. 25, p. 403-411, 2005.

780 PESCHKE, E.; FRESE, T.; CHANKIEWITZ, E. et al. Diabetic Goto Kakizaki rats as
781 well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and
782 na increased pancreatic melatonin-receptor status. **J. Pineal Res.** v. 40, n. 2, p. 135-
783 143, 2006.

784 PINHEIRO, H. A; VILACA, K. H. C; CARVALHO, G. A. Assessment of muscle mass,
785 risk of falls and fear of falling in elderly people with diabetic neuropathy. **Fisiot. Mov.**
786 v. 28, n. 4, p. 677-683, 2015.

787 PYTKA, K.; MLYNIEC, K.; PODKOWA, K. et al. The role of melatonin, neurokinin,
788 neurotrophic tyrosine kinase and glucocorticoid receptors in antidepressant-like effect.
789 **Pharmacol. Rep.** v. 69, n. 3, p. 546-554, 2017.

790 RADZIUK, J.; PYE, S. Diurnal rhythm in endogenous glucose production is a major
791 contributor to fasting hyperglycaemia in type 2 diabetes. Suprachiasmatic deficit or limit
792 cycle behaviour? **Diabetologia**. v. 49, n. 7, p. 1619-28, 2006.

793 REGER, M. A.; WATSON G.S.; FREY, W. H. et al. Effects of intranasal insulin on
794 cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. **Neurobiol.**
795 **Aging**. v. 946, p. 221-31, 2002.

796 REITER, R. J. ; TAN, D. X. ; OSUNA C. et al. Actions of melatonin in the reduction
797 on oxidative stress: a review. **J. Biomed. Res.** v. 7, p. 444-458, 2000.

798 ROMANOVA, S.; MITROVA, N.; GIATTIA, S. et al. Diabetes induces mitochondrial
799 dysfunction and alters cholesterol homeostasis and neurosteroidogenesis in the rat
800 cerebral cortex. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 28, p. 60-68, 2017.

801 RUBIO-SASTRE, P.; SCHEER, F. A.; GOMEZ-ABELLÁN, P. et al. Acute melatonin
802 administration in humans impairs glucose tolerance in both the morning and evening.
803 **Sleep**. v. 37, n. 10, p. 1715-1719, 2014.

804 SAMANTARAY, S.; THAKORE, N. P.; MATZELLE, D. D. et al. Neuroprotective drugs
805 in traumatic CNS injury. **Open Drug Disc. J.**, v. 2, n. 3, p. 174–180, 2010.

806 SANTOMAURO-JUNIOR , A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T. et al.
807 Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome
808 metabólica. **Arq. Bras. Endoc. Metab.** v. 52, n. 1, p. 120-125, 2008.

809 SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chem.**
810 **Res. Toxic.** v. 21, n. 1, p. 172-188, 2008.

811 SCHIAVETO-DE-SOUZA, A.; SILVA, C. A.; DEFINO, H. L. A. et al. Effect of melatonin
812 on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord.
813 **Braz. J. Med. Biol. Res.** v.46, n. 4, p. 348–358, 2013.

814 SCHIMID, H. Impacto cardiovascular da neuropatia autonômica do diabetes Mellitus.
815 **Arq. Bras. Endoc. Metab.** v. 51, n. 2, p. 232-243, 2007.

816 SCHOLTENS, R. M.; VAN-MUNSTER, B. C.; VAN-KEMPEN, M. et al. Physiological
817 melatonina levels in the healthy older people: A systematic review. **J. Psychosom.**
818 **Res.** v. 86, p. 20-27, 2016.

819 SEKKIN, S.; IPEK, E. D.; BOYACIOGLU, M. et al. DNA protective and antioxidative
820 effects of melatonina in streptozotocin-induced diabetic rats. **Turk. J. Biol.** v. 39, p.
821 932-940, 2015.

822 SHAN D. E.; HO, D. M. T.; CHANG, C. et al. Hemichorea–hemiballism: an explanation
823 for MR signal changes. **Am. J. Neuroradiol.** v. 19, p. 863–870, 1998.

824 SHETH, N.; TATA, A. Diabetes-induced peripheral neuropathy: a treatment review.
825 **Formulary.** v. 47, n. 4, p.142-153, 2012.

826 SHULMAN, R. G; RHOTMAN, D. L.; BEHAR, K. et al. Energetic basis of brain activity:
827 implications for neuroimaging. **Trends Neurosci.** v. 27, n. 8, p. 489-495, 2000.

828 SIMMONEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message
829 in mammals: a review of the complex regulation of melatonina synthesis by
830 Norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol. Rev.** v. 55, n. 2,
831 p. 235-95, 2003.

832 SINCLAIR, A. J.; DENO VAN, B.; MATHAI, M. et al. Omega 3 fatty acids and the brain:
833 review of studies in depression. **Asia Pac. J. Clin. Nut.** v. 16, p. 391-397, 2007.

834 SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tipos de Diabetes. Disponível em:
835 <http://www.diabetes.org.br/publico/diabetes/tipos-de-diabetes>. Acesso em:
836 07/02/2017.

837 SOLMAZ, V.; ÇINAR, B. P.; YIGITTÜRK, G. et al. Neuroprotective effects of octreotide
838 on diabetic neuropathy in rats. **Biomed. Pharmacother.** v. 89, p. 468-472, 2017.

839 SOUZA, J. R. M.; OLIVEIRA, R. T.; BLOTA, M. L. H. L. et al. Níveis séricos de
840 interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome
841 coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo
842 2. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

843 SOUZA, W. L.; MORAES, E. A.; COSTA, J. M. S. et al. Efeito de diferentes
844 concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse
845 oxidativo após criopreservação. **Pesq. Vet. Bras.** v. 36, n. 7, p. 657-664, 2016.

846 STEVENS, R. G.; BLASK, D. E.; BRAINARD, G. C. et al. Meeting report: the role of
847 environmental lighting and circadian disruption in câncer and other diseases. **Environ.**
848 **Health Perspect.** v. 115, p. 1357-62, 2007.

849 SUMAYA I.C.; MASANA M.I.; DUBOCOVICH M.L. The antidepressant-like effect of
850 the melatonin receptor ligand luzindole in mice during forced swimming requires
851 expression of MT2 but not MT1 melatonin receptors. **J. Pineal Res.** v. 39, n. 2, p.170-
852 7, 2005.

853 SUMITA, N. M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do
854 diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **J. Bras. Patol.**
855 **Med. Laborat.** v. 44, n. 3, p. 169-174, 2008.

856 TAVARES, B. C.; BARRETO, F. A.; LODETTI, M. L. et al. Resiliência de pessoas com
857 Diabetes Mellitus. **Texto e contexto - enferm.** v. 20, n. 4, p. 751-757, 2011.

858 TESFAYE, S.; BOULTON, A. J.; DYCK, P. J. et al. Neuropathies: update on
859 definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. **Diabetes Care.**
860 v. 33, n. 10, p. 2285-2293, 2010.

861

862 TESFAYE, S.; SELVARAJAH, D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and
 863 management of diabetic peripheral neuropathy. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 28, p.
 864 8-14, 2012.

865 TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **J. Bras. Med.** v. 102, p. 7-12,
 866 2014.

867 VAN-ELDEREN, S.G.C.; ROOS, A.; CRAEN, A. J. et al. Progression of brain atrophy
 868 and cognitive decline in diabetes mellitus. **Neurology.** v.75, n. 997–1002, 2010.

869 VAN-HARTEN, B.; LEEUW, F.; WEINSTEIN, H.C. et al. Brain imaging in patients with
 870 diabetes — a systematic review. **Diabetes Care.** v.29, p. 2539–2548, 2006.
 871

872 VELAZQUEZ, E.; BLAZQUEZ, E.; RUIZ-ALBUSAC, J. M. Synergistic effect of
 873 glucagon-like peptide 2 (GLP-2) and of key growth factors on the proliferation of
 874 cultured rat astrocytes. Evidence for reciprocal upregulation of the mRNAs for GLP-2
 875 and IGF-I receptors. **Mol. Neurobiol.** v. 40, p.183-93, 2009.

876 VITALE, R. F.; RIBEIRO, F. A. Q. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-
 877 alfa) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha
 878 média. **Rev. Bras. Otorrinolaring.** v. 73, n. 1, p. 123-127, 2007.

879 WANG, X. The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases.
 880 **Neurosci. Therap.** v. 15, n, 4, p. 345–357, 2009.

881 WINIARSKA, K.; FRACZYK, T.; MALINSKA D. Melatonin attenuates diabetes-induced
 882 oxidative stress in rabbits. **J. Pineal Res.** v. 40, p.168-176, 2006.
 883

884 ZAWILSKA, J. B.; SKENE, D. J.; ARENDT, J. Physiology and pharmacology of
 885 melatonina in relatin to biological rhythms. **Pharmacol. Rep.** v. 61, p.383-410, 2009.

886 ZEPHY, D.; AHMAD, J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonina and oxidative
 887 stress. **Diabetes Metab. Syndr.** v. 9, p. 127-131, 2015.

888

889

CAPÍTULO II

Avaliação histomorfométrica e imunohistoquímica do córtex cerebral frontal em ratos
diabéticos após o tratamento com melatonina

Marina Gomes Pessoa Baptista¹, Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Valéria Wanderley
Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^{1*}

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia
Animal, 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.teixeira@ufrpe.br
(TEIXEIRA, A.,A.,C.)

RESUMO

Sabe-se que o sistema nervoso central é vulnerável a complicações originadas pelo diabetes levando ao aumento do estresse oxidativo no cérebro, resultando em lesões no córtex cerebral dentre outras regiões. A insulina e hipoglicemiantes ainda são os tratamentos mais utilizados, entretanto, pesquisas atuais com modelo experimental do diabetes sugerem a utilização de antioxidantes como, por exemplo, a melatonina. Assim, testamos a hipótese de que a melatonina exógena pode diminuir ou prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro de ratos. Foram utilizados 50 ratos albinos, divididos em 5 grupos: **GC**: ratos sem indução ao diabetes; **GD**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina; **GDM**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina; **GDI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com insulina; **GDMI**: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina e insulina simultaneamente. O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de estreptozotocina (60 mg/kg). A insulina (5 U/dia) foi administrada por via subcutânea e a melatonina (10 mg/kg) pela água de beber. Ambos tratamentos foram realizados durante 30 dias após a indução. Foram analisados o peso dos animais, do cérebro, as citocinas IL-6 e TNF- α , apoptose, glicogênio, além da morfometria e histopatologia do córtex frontal. Os resultados mostraram que o córtex cerebral dos animais diabéticos apresentaram degeneração axonal, redução do número de neurônios no córtex, redução do glicogênio, aumento da expressão do IL-6 e TNF- α , elevação do índice apoptótico, além da redução do peso dos animais e do cérebro. O tratamento com melatonina associada ou não a insulina preveniu tais efeitos. Assim, concluímos que a melatonina associada ou não a insulina pode ser uma alternativa na prevenção dos efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro.

Palavras-chave: diabetes, cérebro, melatonina, citocinas, apoptose, morfometria, ratos.

ABSTRACT

It is known that the central nervous system is vulnerable to complications caused by diabetes. This complications leads to increased oxidative stress in the brain, resulting in damage to the cerebral cortex among other regions. Insulin and hypoglycemic agents are still the most widely used treatments, however, current research with an experimental model of diabetes suggests the use of antioxidants, such as melatonin. Thus, we tested the hypothesis that exogenous melatonin may decrease or prevent the effects of diabetes in the frontal cortex of rat brain. Fifty albino rats were divided into 5 groups: **GC**: rats without diabetes induction; **GD**: diabetic rats induced by streptozotocin; **GDM**: streptozotocin-induced and melatonin-treated diabetic rats; **GDI**: diabetic rats induced by streptozotocin and treated with insulin; **GDMI**: diabetic rats induced by streptozotocin and treated with melatonin and insulin simultaneously. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60 mg/kg). Insulin (5 U/day) was administered subcutaneously and melatonin (10 mg/kg) by drinking water. Both treatments were performed for 30 days after induction. The animals' weight, the cytokines IL-6 and TNF- α , apoptosis, glycogen, and morphometry and histopathology of the frontal cortex were analyzed. The results showed that the cerebral cortex of the diabetic animals presented axonal degeneration, reduced number of neurons in the cortex, reduced glycogen, increased IL-6 and TNF- α expression, elevated apoptotic index, and reduced animal weight and the brain. Treatment with melatonin associated or not with insulin prevented such effects. Thus, we conclude that melatonin associated or not with insulin may be an alternative in preventing the effects of diabetes in the frontal cortex of the brain.

Key words: diabetes, brain, melatonin, cytokines, apoptosis, morphometry, rats.

1. Introdução

Há vários anos, o interesse pelos efeitos do diabetes no cérebro tem aumentado significativamente. Sabe-se que o sistema nervoso central é vulnerável a complicações originadas pelo diabetes causadas pela hiperglicemia crônica (BIELSSELS et al., 2002; van HARTEN et al., 2006; FRANCIS et al., 2008; KODL et al., 2008; YAU et al., 2009; YANG et al., 2011; HUANG et al., 2012; YOON et al., 2017). Diversos estudos demonstraram que as modificações vasculares e metabólicas ocasionadas por essa patologia podem acarretar em danos ao cérebro, atrofia cerebral, alterações estruturais e eletrofisiológicas, como também a prejuízos a função cognitiva (van ELDEREN et al., 2010; FRANC et al., 2011; LOUZADA; VARGAS 2015).

Embora, vários estudos relatem efeitos adversos do diabetes mellitus no hipocampo, hipotálamo e cerebelo (JACKSON-GUILFORD et al., 2000; PIOTROWSKI et al., 2001; LI et al., 2002; BEAUQUIS et al., 2006; KHAKSAR et al., 2010; AHMADPOUR; HAGHIR 2011;), pesquisas tem demonstrado que pacientes diabéticos apresentam lesões na substância branca do córtex frontal do cérebro (HSU et al. 2012).

O diabetes estimula danos ao neurônio, aumentando o número de células apoptóticas e uma disfunção cognitiva seguida de um aumento acentuado do estresse oxidativo no cérebro (WANG et al., 2010). Além disso, pacientes portadores de diabetes apresentam níveis maiores da concentração plasmática de citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , onde estes podem potencializar quadros de inflamação (SAMUEL et al., 2012).

Com avanços significativos realizados para que seja possível compreender os mecanismos envolvidos na origem das complicações cerebrais, novas modalidades de tratamento vem sendo exploradas (EDWARDS et al., 2008). Desta forma, recentes estratégias para a prevenção e tratamento das complicações resultantes do diabetes tem sido estudadas. A insulina e hipoglicemiantes ainda são os tratamentos mais utilizados, entretanto, pesquisas

atuais com modelo experimental do diabetes apontam novos antioxidantes como uma abordagem terapêutica para a prevenção e tratamento para os danos neurológicos (LOUZADA ; VARGAS 2015).

Diversos estudos apontam a melatonina como um antioxidante e um eliminador de radicais, por estimular a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione redutase (EL-SOKKARY et al., 2003). Este hormônio também desempenha um importante papel na neuroproteção de diversos distúrbios neurodegenerativos cuja patogênese envolve espécies reativas de oxigênio (BAYDAS et al., 2001), além de possuir efeitos anti-inflamatório e modular o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 6 (IL-6) (HERNANDEZ-VELAZQUEZ et al., 2016). Assim, testamos a hipótese de que a melatonina exógena pode diminuir ou prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), com 60 dias de idade, virgens, pesando aproximadamente $\pm$ 250 g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*, permanecendo em condições padrões de $\pm$ 22 °C com período de luz entre 06:00 - 18:00 horas, divididos nos seguintes grupos:

Grupo GC: Ratos sem a indução ao diabetes;

Grupo GD: Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina;

Grupo GDI: Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com insulina;

Grupo GDM: Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina;

Grupo GDMI: Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina e insulina simultaneamente.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 36/2017.

2.1. Indução do diabetes

O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dose 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 do tratamento todos os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002). A confirmação do diabetes foi feita após 7 dias da administração da estreptozotocina. Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ) (SPADELLA et al., 2005). A glicemia de jejum dos animais foi monitorada durante o período experimental, sendo nos dias: 0 (antes da indução), 7 (confirmação do diabetes), 15 e 30 dias após administrações de melatonina ou insulina.

2.2. Tratamento com melatonina

O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado durante 30 dias na água de beber. Para isso, a melatonina (10 mg/kg) foi dissolvida em etanol e diluída em solução salina, e adicionada na água de beber. As garrafas de 700 mL eram cobertas com papel

alumínio e colocadas nas gaiolas sempre no início da noite (18:00h) e retiradas na manhã seguinte (6:00h). Durante o dia era feita restrição de água aos animais.

2.3. Tratamento com insulina

A insulina foi administrada por via subcutânea durante 30 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10h, e três unidades restantes às 19h (PINHEIRO et al., 2011).

2.4. Peso dos animais e dos cérebros

Os animais dos grupos experimentais foram pesados diariamente durante o experimento. Após 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com hidrocloreto de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, associado a 100 mg/kg de tiopental intraperitoneal. Após o processo de eutanásia, os cérebros foram retirados, pesados em balança analítica. Posteriormente fragmentos do córtex frontal foram fixados em formaldeído a 10% tamponado, e processados para inclusão em parafina.

2.5. Histopatologia e histoquímica

Cortes contendo secções transversais do córtex frontal foram submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) para análise histopatológica e pelo Acido Periódico de Schiff (PAS) para o glicogênio. Foi realizada a quantificação do teor de glicogênio através de imagens capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para elaboração de histograma RGB (Red-Green-Blue) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

2.6. Morfometria

Três lâminas por animal/grupo foram avaliadas. O volume [V (ref)] do córtex frontal foi obtido pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN; JENSEN 1987). A estimativa da densidade numérica dos neurônios (Nv) no córtex foi calculada usando o método descrito por Gundersen (1986) e Villeda-Hernández et al. (2006). O total do número de neurônios (N) foi calculado por meio da seguinte fórmula: $N = V \text{ (ref)} \cdot Nv$ (Korbo et al., 1990; West 1993). Na substância branca realizou-se uma avaliação morfométrica do percentual de fibras nervosas utilizando-se uma ocular de 10x (contendo internamente um retículo de WAIBEL com 25 pontos) (WEIBEL et al., 1966) e objetiva de 40x, onde foram contados seis campos, todos aleatórios e em sentido horário, levando-se em consideração apenas os pontos que incidiram sobre as fibras. No total foram contados 150 pontos por animal totalizando 450 pontos por grupo.

2.7 Imunohistoquímica (IL6, TNF- α e apoptose)

A expressão de citocinas inflamatórias foi determinada utilizando os anticorpos para IL-6 e TNF α (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:30. As lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens

foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony[®], acoplada ao microscópio Olympus[®] Bx 50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue) (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001).

Para apoptose foi utilizado o método TUNEL (Kit Apoptag – Millipore). Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, 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 equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em TdT a 37 °C 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, DakoCytomationTM) (± 20 minutos), sendo contracorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, 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 pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013).

2.8. Análise estatística

Para análise estatística da quantificação do glicogênio, morfometria, peso dos animais, peso do cérebro, índice apoptótico, e da expressão do TNF α e IL-6 foi utilizado o método não paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS:

3.1 Níveis glicêmicos

Antes do processo de indução ao diabetes, todos os animais dos grupos experimentais apresentaram níveis de glicose sanguínea abaixo de 120 mg/dL, não apresentando diferenças significativas. Aos 7 dias todos os grupos, com exceção do controle, apresentaram glicemia acima de 300 mg/dL. Após 15 e 30 dias do tratamento, apenas os animais do grupo diabético (GD) continuaram a apresentar a média de glicose bastante elevada (474 mg/dL), enquanto que os grupos tratados com insulina (GDI), melatonina (GDM) e melatonina/insulina (GDMI) exibiram valores de glicose estatisticamente semelhante ao grupo controle (GC) (Tabela 1).

3.2 Peso dos animais e dos cérebros

Houve perda progressiva de peso nos animais do grupo GD em relação ao controle e aos demais grupos. Os grupos tratados (GDI, GDM e GDMI) também apresentaram redução de peso quando comparados ao controle, porém sem apresentarem diferenças significativas entre eles (Tabela 2). Na análise do peso dos cérebros dos grupos experimentais, o grupo GD apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos, evidenciando um menor valor. Os grupos tratados com insulina (GDI), melatonina (GDM) e com melatonina/insulina (GDMI) não apresentaram diferenças relevantes em relação ao grupo GC (Fig. 1).

3.3. Histopatologia e histoquímica

Na região cortical não foram observados alterações histopatológicas como degeneração ou atrofia ou vacuolização neuronal. Entretanto, na substancia branca verificou-se um número

significativo de regiões apresentando várias fibras nervosas desprovidas de axônio nos animais do grupo GD (Fig. 2). A análise histoquímica pelo PAS revelou redução significativa do glicogênio no córtex dos animais do grupo GD em relação aos demais grupos. Os animais dos grupos tratados com melatonina associado ou não a insulina apresentaram características semelhantes às observadas nos animais do controle (Fig. 3).

3.4. Morfometria

A quantificação de neurônios no córtex frontal do cérebro dos animais dos grupos experimentais revelou redução significativa nos animais do grupo GD em relação aos demais grupos. Não houve diferenças significativas entre o grupo GC e os tratados com melatonina associada ou não a insulina (Fig. 4).

3.5 Imunohistoquímica (IL-6, TN- α e apoptose)

A imunohistoquímica para IL-6 revelou que os animais do grupo diabético (GD) apresentaram uma forte marcação no córtex cerebral (Fig. 5B). Entretanto, no grupo controle (GC) (Fig. 5A), tratado com insulina (GDI) (Fig. 5C), melatonina (GDM) (Fig. 5D) e com melatonina/insulina (GDMI) (Fig. 5E) evidenciou-se uma marcação similar, não apresentando diferença significativa entre esses grupos (Fig. 5F). Para o TNF- α o grupo controle (GC) (Fig. 6A), tratado com insulina (GDI) (Fig. 6C), com melatonina (GDM) (Fig. 6D), e com melatonina/insulina (GDMI) (Fig. 6E) tiveram uma marcação equivalente, não apresentando diferença significativa. Por outro lado, o grupo diabético (GD) (Fig. 6B) apresentou uma forte marcação na região cortical, diferindo significativamente dos demais grupos (Fig. 6F).

O teste TUNEL revelou um alto índice de apoptose do córtex cerebral dos animais do grupo GD quando comparados aos animais dos demais grupos (Fig. 6).

4. DISCUSSÃO

Em relação aos valores glicêmicos, estudos indicam que a melatonina não reduz valores hiperglicêmicos em estado de diabetes (CAM et al., 2003). Entretanto, pesquisas realizadas em modelos experimentais sugerem que exista uma relação positiva entre a melatonina e a insulina. Sartori et al. (2009) mostraram que a melatonina aumentou a sensibilidade à insulina, além de estimular a secreção deste hormônio. Isto corrobora com nossos achados em que os animais do grupo tratado com melatonina e insulina apresentaram valores de glicose semelhantes aos do grupo controle.

Sabe-se que a perda de massa muscular é uma característica do estado diabético. Acredita-se que esta seja resultante de uma alteração no metabolismo de proteínas no estado de hiperglicemia, no qual este pode ser caracterizado por um aumento no catabolismo de proteínas e gorduras, levando a uma diminuição da massa corporal dos animais (LUCIANO ; MELLO, 1999; MOURA et al., 2012), o que pode justificar os resultados observados nos animais do grupo diabético. Por outro lado, os animais dos grupos tratados com insulina associada ou não a melatonina também demonstraram perda de peso em relação aos animais do grupo controle, porém com menor intensidade que os do grupo diabético. Isso demonstra que tanto a insulina como a melatonina podem regular o peso corpóreo através do balanço energético, no qual toda energia captada pela alimentação é utilizada e armazenada como estoque energético (SBEM, 2017).

Sabe-se que o cérebro é extremamente dependente da glicose, e pode ser danificado por anormalidades induzidas pela hiperglicemia (BLURTON-JONES et al., 2009, YAMADA et

al, 2002). Isso ocorre porque os distúrbios do transporte neuronal de glicose e do metabolismo na hiperglicemia podem induzir a produção de uma quantidade aumentada de radicais livres em condição diabética e subsequentemente afetar negativamente a produção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). O BDNF desempenha um papel importante na sobrevivência dos neurônios, no seu crescimento (axônios e dendritos), e na formação e função das sinapses (YAMADA et al, 2002; BLURTON-JONES et al, 2009). Isso poderia explicar a degeneração do axônio na substância branca e redução dos teores de glicogênio no córtex dos animais diabéticos, o que foi prevenido nos animais tratados com melatonina independente da associação com a insulina, provavelmente pela capacidade dessa melatonina promover a expressão do BDNF (LUO et al., 2017). Com relação a insulina, Ghasemi et al. (2013) relataram a presença de maior quantidades de receptores desse hormônio em vários locais como o bulbo olfativo, córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e plexo coróide, sugerindo sua importância na sobrevivência neuronal, na plasticidade sináptica e na absorção da glicose (BANKS, 2004).

A análise morfológica revelou redução do número de neurônios no córtex frontal dos animais do grupo diabético sem tratamento. Isso sem dúvida está relacionado ao alto índice apoptótico observado nesses animais, justificando também a redução do peso do cérebro em relação aos animais dos demais grupos. A apoptose é uma série de processos programados para a execução da morte celular, e desempenha um papel significativo na manutenção da homeostase dos tecidos. Quando desregulado, este processo é associado a diversos estados patológicos como doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (LEE; PERVAIZ, 2007; DOSERMANS et al., 2017).

Em estudos relacionados com o sistema nervoso central, a administração de melatonina exógena resultou em uma diminuição de células TUNEL-positivas, indicando o efeito neuroprotetor deste hormônio e sugerindo que a melatonina poderia atuar na prevenção de doenças neurodegenerativas através da inibição da via intrínseca da apoptose (LIMA et al., 2005;

TUZCU; BAYDAS, 2006; FERREIRA et al., 2010; BRAZ, 2015). No que se refere a insulina, esta é capaz de inibir a apoptose em situações de estresse oxidativo, isquemia e toxicidade do peptídeo β -amilóide (GHASEMI et al., 2013; BRAZ 2015).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental na patogênese do diabetes (GOSH et al., 2015). Nossos resultados mostraram que houve uma forte marcação da IL-6 e do TNF- α na área cortical do cérebro dos animais do grupo diabético em relação aos animais dos demais grupos. Isso estabelece a presença de um processo de neurodegeneração o que pode levar a complicações cerebrais (WAJANT et al., 2003; NEGI et al., (2010); CUTANDO et al., 2015). No entanto, esses efeitos foram prevenidos pela melatonina associada ou não a insulina, certamente pelo fato desse hormônio ser um potente inibido de interleucinas inflamatórias (KUMAR; SHARMA, 2010; SERAPHIM et al., 2010). Além disso, estudos comprovam a ligação da insulina com a regulação da resposta inflamatória, uma vez que este hormônio participa de processos que inibem a produção de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- α (BRAZ et al., 2015).

Diante dos resultados, pode-se concluir que o tratamento com melatonina associada ou não a insulina se mostrou benéfico para prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro de ratos. Entretanto, a importância clínica e fisiológica dessa administração exige mais esclarecimentos para melhor compreensão dos mecanismos pelo qual a melatonina exerce esses efeitos benéficos.

5. REFERÊNCIAS

AHMADPOUR, S. H.; HAGHIR, H. Diabetes mellitus type 1 induces dark neuron formation in the dentate gyrus: a study by Gallyas' method and transmission electron microscopy. Rom. J. Morphol. Embryol. v. 52, n. 2, p. 575-579, 2011.

1236 BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* v. 490, n. 3, p. 5-12, 2004.

1237 BEAUQUIS, J.; ROIG, P.; HOMO-DELARCHE, F.; DE-NICOLA, A.; SARAIVA, F.
 1238 Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocininduced
 1239 diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci.* v. 23, n. 6, p. 1539-46,
 1240 2006.

1241 BAYDAS, G.; ERÇEL, E.; CANATAN, H.; DONDER, E.; AKYOL, A. Effect of melatonina
 1242 on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell.*
 1243 *Biochem. Funct.* v. 19, p. 37-41, 2001.

1244 BLURTON-JONESA, M.; KITAZAWAA, M.; MARTINEZ-CORIAA, H.; CASTELLOA, N.
 1245 A.; MALLERB, F.; LORING, J. F.; YAMASAKIA, T. R. POONA, W. W.; GREENA, K. N.;
 1246 LAFERLA, F. M. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of
 1247 Alzheimer disease . *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 32, p. 13594-13599 , 2009.

1248 CAM, M.; YAVUZ, O.; GUVEN, A.; ERCAN, F.; BUKAN, N.; USTÜNDAG, N. Protective
 1249 effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic
 1250 rats. *J. Pineal Res.*, v. 35, p. 212-220, 2003.

1251 CUTANDO, A.; MONTERO, J.; GOMEZ-DE-DIEGO, R.; FERRERA, M. J.; LOPEZ-
 1252 VALVERDE, A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive
 1253 protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in patients with
 1254 type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J. Clin. Exp. Dent.* v. 5, p. 1-7, 2015.

1255 DALL'AGO, P.; SILVA, V. O.; DE-ANGELIS, K. L.; IRIGOYEN, M. C.; FAZAN, R. J.;
 1256 SALGADO, H. C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin
 1257 diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 7, n. 35, p. 843-849, 2002.

1258 DORSEMANS, A. C.; COURET, D.; HOARAU, A; MEIHAC, O.; LEFEBVRE, D. C.;
1259 DIOTEL, N. Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and
1260 zebrafish models. *Neurogenesis*. v. 1, p. 31-4, 2017.

1261 EDWARD, J. L.; VICENT, A. M.; CHENG, H. T.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy:
1262 Mechanisms to management. *Pharmacol. Ther.* v. 120, p. 1-34, 2008.

1263 EL-SOKKARY, G. H.; KAMEL, E. S.; REITER, R. J. Prophylactic effect of melatonin in
1264 reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell. Mol. Biol. Lett.* v. 8, p. 461-470, 2003.

1265 FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E.
1266 C.; SOARES-JR, J. M. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v. 56,
1267 n. 6, p. 715-718, 2010.

1268 FRANC, D. T.; KODL, C. T.; MUELLER, B. A.; MUETZEL, R. L.; LIM, K. O.; SEAQUIST,
1269 E. R. High connectivity between reduced cortical thickness and disrupted white matter tracts in
1270 long-standing type 1 diabetes. *Diabetes*. v. 60, p. 315–319, 2011.

1271 FRANCIS, G. J.; MARTINEZ, J. A.; LIU, W. Q.; XU, K.; AYER, A.; FINE, J.; TUOR, U. I.;
1272 GLAZNER, G.; HANSON, L. R.; FREY, I. I. W. H.; TOTH, C. Intranasal insulin prevents
1273 cognitive decline, cerebral atrophy and whitematter changes in murine type I diabetic
1274 encephalopathy. v. 131, p. 3311-3334, 2008.

1275 GHOSH, S.; BANERJEE, S.; PARAMES, P. The beneficial role of curcumin on inflammation,
1276 diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* v. 6, 2015.

1277 GHASEMI, R.; HAERI, A.; DARGAHI, L.; MOHAMED, Z.; AHMADIANI, A. Insulin in the
1278 brain: sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.* v. 47, p. 145-71, 2013.

1279 HERNANDEZ-VELÁZQUEZ, B.; CAMARA-LEMARROY, C. R.; GONZÁLEZ-
 1280 GONZÁLEZ, J. A.; GARCIA-COMPEAN, D.; MONREAL-ROBLES, R.; CORDERO-
 1281 PÉREZ, P.; MUÑOZ-ESPINOSA, L. E. Efectos de la melatonina en la respuesta inflamatoria
 1282 aguda asociada con la colangiopancreatografía retrógrada endoscópica: un ensayo clínico
 1283 aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo. *Rev. Gastroenterol. Méx.* v. 81, n. 3, p.
 1284 141-148, 2016.

1285 HUANG, M.; GAO, L.; YANG, L.; LIN, F.; LEI, H. Abnormalities in the brain of
 1286 streptozotocin-induced type 1 diabetic rats revealed by diffusion tensor imaging. *NeuroImage.*
 1287 *Clinical.* v. 1, p. 57–65, 2012.

1288 HSU, J. L.; CHEN, Y. L.; LEU, J. G.; JAW, F. S.; LEE, C. H.; TSAI, Y. F.; HSU, C. Y.; BAI,
 1289 C. H.; LEEMANS, A. Microstructural white matter abnormalities in type 2 diabetes mellitus: a
 1290 diffusion tensor imaging study. *NeuroImage.* v. 59, p. 1098–1105, 2012.

1291 JAKOBSEN, J.; SIDENIUS, P.; GUNDERSEN, H. J. G.; OSTERBY, R. Quantitative Changes
 1292 of Cerebral Neocortical Structure in Insulin-Treated Long-Term Streptozocin-Induced Diabetes
 1293 in Rats. *Diabetes.* v. 36, n. 5, p. 597-601, 1987.

1294 KHAKSAR, Z.; JELODAR, G.; HEMATIAN, H. Effect of maternal diabetes on cerebellum
 1295 histomorphometry in neonatal rats. *J. Shaheed Sadoughi Univ. Med. Sci. Health Serv.*, v. 18,
 1296 n. 1, p. 56-63, 2010.

1297 KODL, C. T.; FRANC, D. T.; RAO, J. P.; ANDERSON, F. S.; THOMAS, W.; MUELLER, B.
 1298 A.; LIM, K. O.; SEAQUIST, E. R. Diffusion tensor imaging identifies deficits
 1299 inwhitemattermicrostructure in subjects with type 1 diabetes that correlate with reduced
 1300 neurocognitive function. *Diabetes.* v. 57, p. 3083–3089, 2008.

- 1301 KUMAR, A.; SHARMA, S. S. NF-kappaB inhibitory action of resveratrol: a probable
1302 mechanism of neuroprotection in experimental diabetic neuropathy. *Biochem.Biophysic Res.*
1303 v. 394, p. 360-365, 2010.
- 1304 JACKSON-GUILFORD, J.; LEANDER, J. D.; NISENBAUM, L. K. The effect of
1305 streptozotocin-induced diabetes on cell proliferation in the rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.* v.
1306 293, n. 2, p. 91-94, 2000.
- 1307 LEE, S. C.; PERVAIZ, S. Review Apoptosis in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Int.*
1308 *J. Biochem. Cell Biol.* v. 39, p. 497-504, 2007.
- 1309 LIMA, E.; SOARES, J. M. J.; DEL-CARMEN, S. G. Y.; GOMES, V. S.; PRIEL, M. R.;
1310 BARACAT, E. C.; CARVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; AMADO,
1311 D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in
1312 rats. *Brain Res.* v. 1043, p. 24-31, 2005.
- 1313 LOUZADA, S. M.; VARGAS, C. R. Encefalopatia diabética e depressão: dano oxidativo no
1314 cérebro. *Clin. Biomed. Res.* v. 34, n. 4, p. 184-195, 2015.
- 1315 LUCIANO, E.; MELLO, M. A. R. Atividade física e metabolismo de proteínas em músculo
1316 de ratos diabéticos experimentais. *Rev. Paul. Educ. Fís.* v. 12, p. 202-9, 1999.
- 1317 LUO, Y.; PENG, M.; WEI, H. Melatonin Promotes Brain-Derived Neurotrophic Factor
1318 (BDNF) Expression and Anti-Apoptotic Effects in Neonatal Hemolytic Hyperbilirubinemia via
1319 a Phospholipase (PLC)- Mediated Mechanism. *Med Sci Monit.* v. 23, p. 5951-5959, 2017.
- 1320 MARONESI, C. T. P.; CECAGNO-ZANINI, S. C.; OLIVEIRA, L. Z.; LEGUISAMO, C. P.
1321 Exercícios físicos em portadores de neuropatia diabética: revisão sistemática e metanálise de
1322 ensaios clínicos randomizados. *Rev. Fisio. Pesq.* v. 23, n. 2, p. 216-223, 2016.

1323 MAZEPA, R. C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P. S. ; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Melatonin
 1324 increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* v.
 1325 66, n. 2, p. 153, 2000.

1326 MOURA, L. P.; GOMES, R. J.; LEME, J. A.; VOLTARELLI, F. A.; RIBEIRO, C.; MOURA,
 1327 R. F.; ARAÚJO, M. B.; LUCIANO, E.; MELLO, M. R. Insulina pancreática de ratos diabéticos
 1328 tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. *Motricidade.* v. 8, p.
 1329 23-2, 2012.

1330 PINHEIRO, L.; MELO, A. D.; ANDREAZZI, A. E.; GONZALEZ-GARCIA, R. M. Protocol
 1331 of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and
 1332 Glycemic Variation. *Scandinavian J. Lab. Animal Sci.* v.38, n.2, 2011.

1333 PIOTROWSKI, P.; WIERZBICKA, K.; SMIALEK, M. Neuronal death in the rat hippocampus
 1334 in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants. *Folia Neuropathol.*
 1335 v. 39, n. 3, p. 147-54, 2001.

1336 SARTORI, C.; DESSEN, P.; MATHIEU, C.; MONNEY, A.; BLOCH, J.; NICOD, P.;
 1337 SCHERRER, U.; DUPLAIN, H. Melatonin Improves Glucose Homeostasis and Endothelial
 1338 Vascular Function in High-Fat Diet-Fed Insulin-Resistant Mice. *Endocrinology.* v. 150, n. 12,
 1339 p. 311-7, 2009.

1340 SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; NISHIDE, F. T. A glândula pineal e o metabolismo de
 1341 carboidratos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v. 44, n. 4, p. 331-338, 2000.

1342 SICKMANN, M.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A.; BENIE, A. J.; BOUMAN,
 1343 S. D. Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2
 1344 diabetes rat model. *Neurochem. Int.* v. 60, p. 267-275, 2012.

1345 SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Posicionamento
 1346 da SBEM sobre a melatonina. Disponível em:
 1347 [https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/posicionamento_sobre_melatonina_sbem.](https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/posicionamento_sobre_melatonina_sbem.pdf)
 1348 pdf. Acesso em: 29/12/2017.

1349 TUZCU, A.; BAYDAS, B. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and
 1350 memory impairment in rats. *Eur. J. Pharmacol.* v. 537, p. 106-110, 2006.

1351 VAN-HARTEN, B.; DE-LEEuw, F. E.; WEINSTEIN, H. C.; SCHELTENS, P.; BIESSELS,
 1352 G. J. Brain imaging in patients with diabetes — a systematic review. *Diabetes Care.* v. 29, p.
 1353 2539–2548, 2006.

1354 VAN-ELDEREN, S. G. C.; DE-ROOS, A.; DE-CRAEN, A. J. M.; WESTENDORP, R. G. J.;
 1355 BLAUW, G. J.; JUKEMA, J. W.; BOLLEN, E. L. E. M.; MIDDELKOOP, H. A. M.; VAN-
 1356 BUCHEM, M. A.; VAN-DER-GROND, J. Progression of brain atrophy and cognitive decline
 1357 in diabetes mellitus. *Neurology.* v. 75, p. 997-1002, 2010.

1358 ZHANG, L.; ZHANG, W.; GRUNBERGER, G.; SIMA, A. A. Hippocampal neuronal
 1359 apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res.* v. 946, n. 2, p. 221-31, 2002.

1360 WANG, C. F.; LI, D. Q.; XUE, H. Y.; HU, B. Oral supplementation of catalpol ameliorates
 1361 diabetic encephalopathy in rats. *Brain Res.* v. 13, n. 7, p. 158-165, 2010.

1362 WAJANT, H. PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell*
 1363 *Death Differ.* v. 10, p. 45-65, 2003.

1364 WIETZYCOSKY, C. R.; MARCHESINI, J. C. D.; AL-THEMYAT, S.; MEYER, F. S.;
 1365 TRINDADE, M. R. M. Melhora do estresse oxidativo após duodenojejunostomia em um
 1366 modelo experimental de diabetes mellitos tipo 2. *Arq. Bras. Cir. Dig.* v. 29, p. 3-7, 2016.

1367 WILLIAMSON, R.; MCNEILLY, A.; SUTHERLAND, C. Insulin resistance in the brain: An
1368 old-age or new-age problem? *Biochem. Pharmacol.* v. 83, p. 737-745, 2012.

1369 WU, X.; CHENG, B.; CAI, Z. D.; LIE-MING, L. Determination of the apoptotic index in
1370 osteosarcoma tissue and its relationship with patients prognosis. *Cancer Cell Int.* v. 13, n.56, p.
1371 1-4, 2013.

1372 YAMADA, K.; MIZUNO, M.; NABESHIMA, T. Role for brain-derived neurotrophic factor in
1373 learning and memory. *Life Sci.* v. 70, n. 7, p. 735-744, 2002.

1374 YANG, C.; DE-VISSER, A.; MARTINEZ, J. A.; POLIAKOV, I.; ROSALES-HERNANDEZ,
1375 A.; AYER, A.; GARVEN, A.; ZAVER, S.; RINCON, N.; XU, K.; TUOR, U. I.; SCHMIDT,
1376 A. M.; TOTH, C. Differential impact of diabetes and hypertension in the brain: adverse effects
1377 in white matter. *Neurobiology of Disease.* v. 42, p. 446-458, 2011.

1378 YAU, P. L.; JAVIER, D.; TSUI, W.; SWEAT, V.; BRUEHL, H.; BOROD, J. C; CONVIT, A.
1379 Emotional and neutral declarative memory impairments and associated white matter
1380 microstructural abnormalities in adults with type 2 diabetes. *Psychiatry Res.* v. 174, p. 223–
1381 230, 2009.

1382 YOON, S.; CHO, H.; KIM, J.; LEE, D. W.; KIM, G. H.; HONG, Y. S.; MOON, S.; PARK, S.
1383 LEE, S.; BAE, S.; SIMONSON, D. C.; LYOO, I. K. Brain changes in overweight/obese and
1384 normal-weight adults with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* v. 60, n. 7, p. 1207-1217,
1385 2017.

1386

1387

1388

1389 Tabela 1: Níveis séricos de glicose (mg/dL) nos animais dos grupos experimentais.

Grupos	0 dia indução	7 dias confirmação	15 dias da indução	30 dias da indução
GC	96,75 ± 5,17a	99,17 ± 2,14b	102,30 ± 3,47b	110,80 ± 7,46b
GD	95,00 ± 3,36a	349,06 ± 12,02a	348,80 ± 11,43a	474,00 ± 9,87a
GDI	92,25 ± 4,38a	338,77 ± 9,43a	110,30 ± 7,59b	128,30 ± 10,23b
GDM	92,00 ± 3,55a	343,91 ± 7,88a	117,50 ± 9,80b	120,30 ± 8,16b
GDMI	91,64 ± 3,09a	335,48 ± 11,22a	108,44 ± 8,12b	119,58 ± 7,39b
P	0,0763	0,0223	0,0066	0,0132

1390 Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de

1391 Dunn ($p < 0,05$).

1392

1393

1394

1395

1396 Tabela 2: Peso dos animais dos grupos experimentais.

Grupos	0 dia indução	7 dias confirmação	15 dias da indução	30 dias da indução
GC	245,30 ± 7,54a	273,80 ± 2,50a	284,50 ± 19,82a	305,50 ± 6,85a
GD	247,80 ± 9,28a	202,50 ± 7,72c	144,30 ± 7,18c	118,00 ± 3,55c
GDI	246,30 ± 6,39a	241,30 ± 11,59b	242,00 ± 10,03b	264,30 ± 3,40b
GDM	240,00 ± 7,07a	237,30 ± 8,84b	235,00 ± 10,98b	255,30 ± 9,81b
GDMI	239,80 ± 5,56a	243,00 ± 3,74b	238,50 ± 17,82b	259,30 ± 3,20b
P	0,4242	0,00101	0,0323	0,0004

1397 Médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem significativamente pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

1398

1399

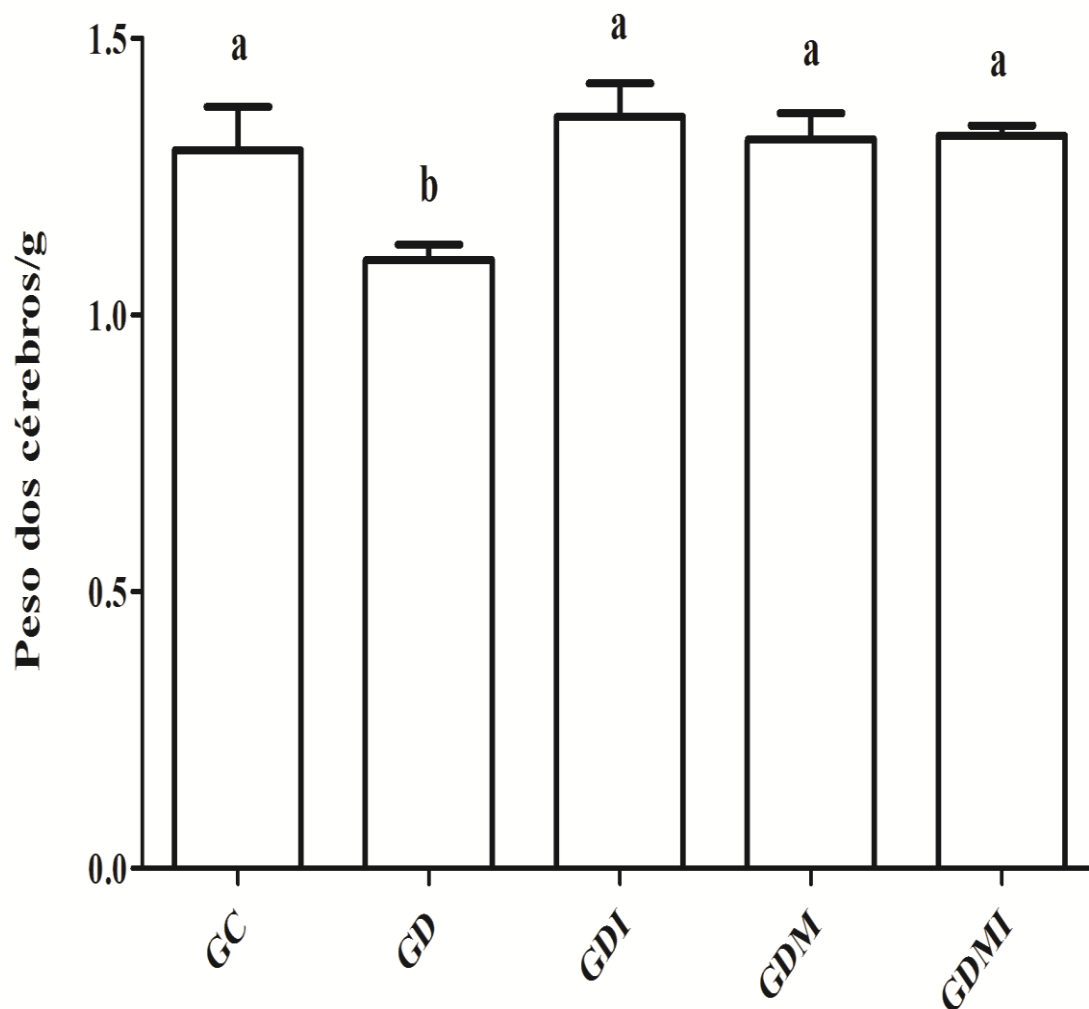


Figura 1. Peso dos cérebros dos animais dos grupos experimentais. GC - grupo controle; GD - grupo diabético; GDI - grupo diabético tratado com insulina; GDM - grupo diabético tratado com melatonina; GDMI - grupo diabético tratado com melatonina/insulina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Dunn ($p < 0,05$).

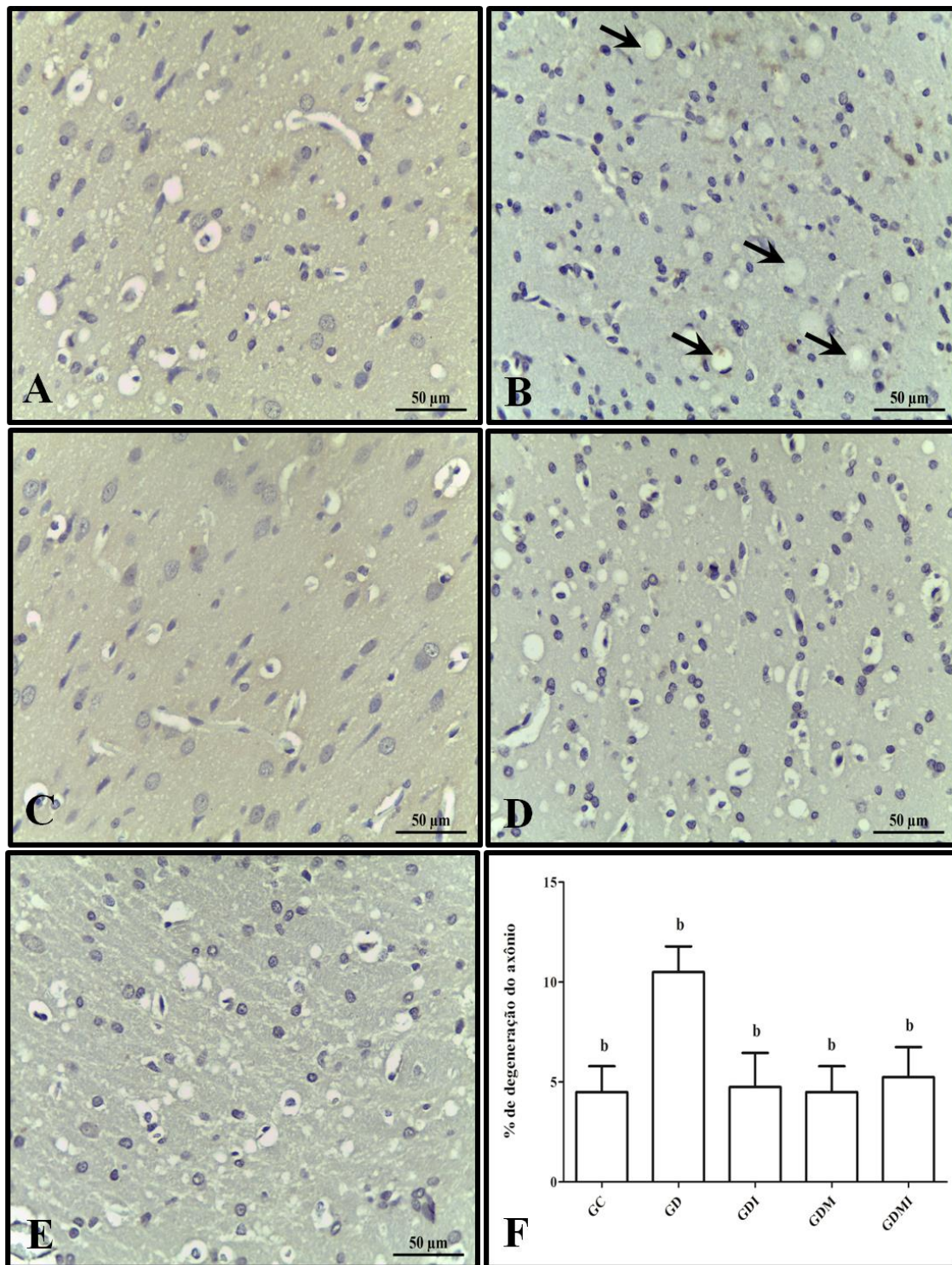


Figura 2. Fotomicrografia da substância branca do cérebro dos animais dos grupos experimentais. A (GC); B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Percentual de fibras nervosas sem axônio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). H.E. Setas - fibras nervosas sem axônio.

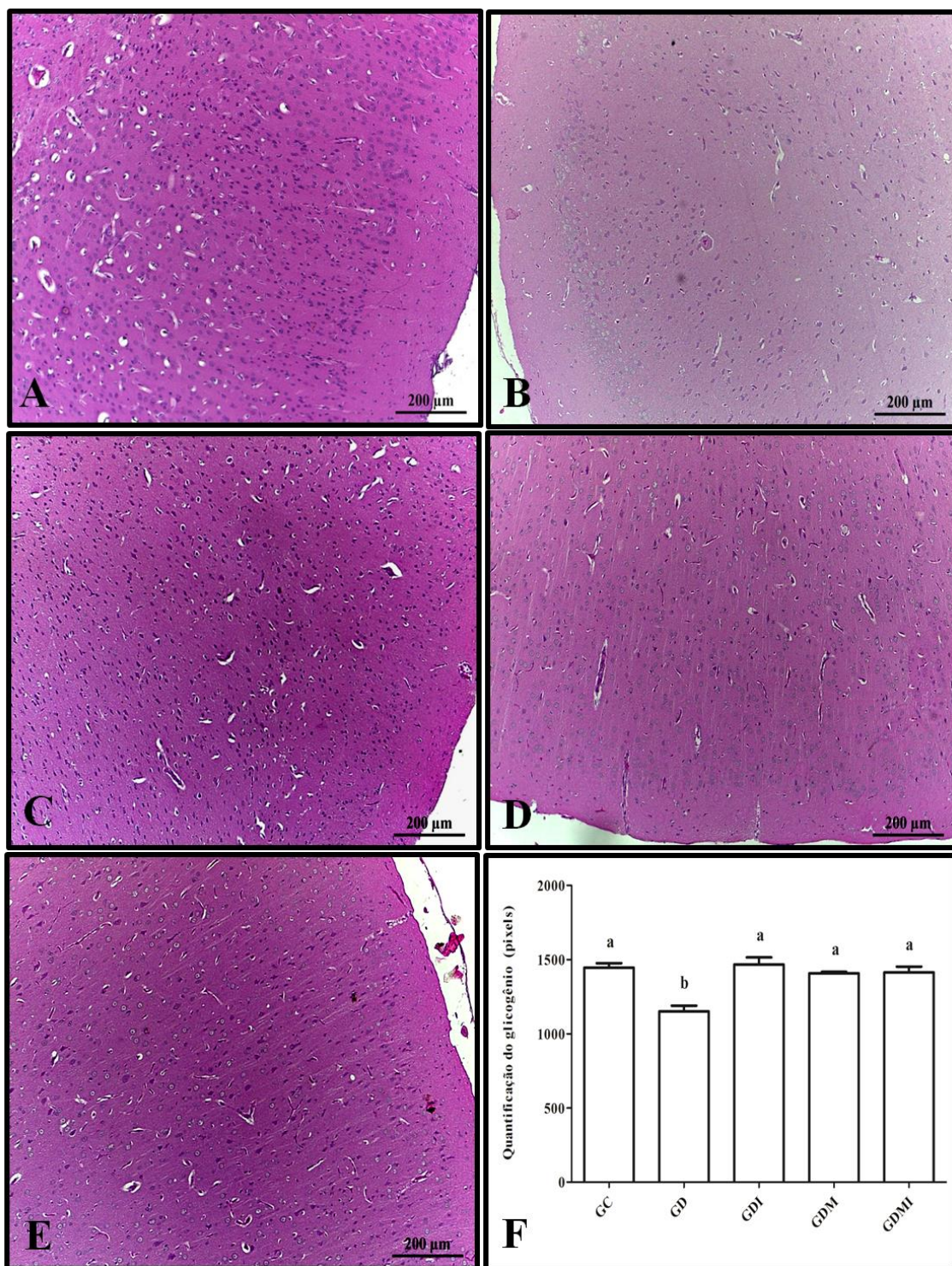


Figura 3. Fotomicrografia do córtex cerebral dos animais dos grupos experimentais. A (GC); B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Quantificação em pixels do teor de glicogênio. Notar redução significativa no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). PAS.

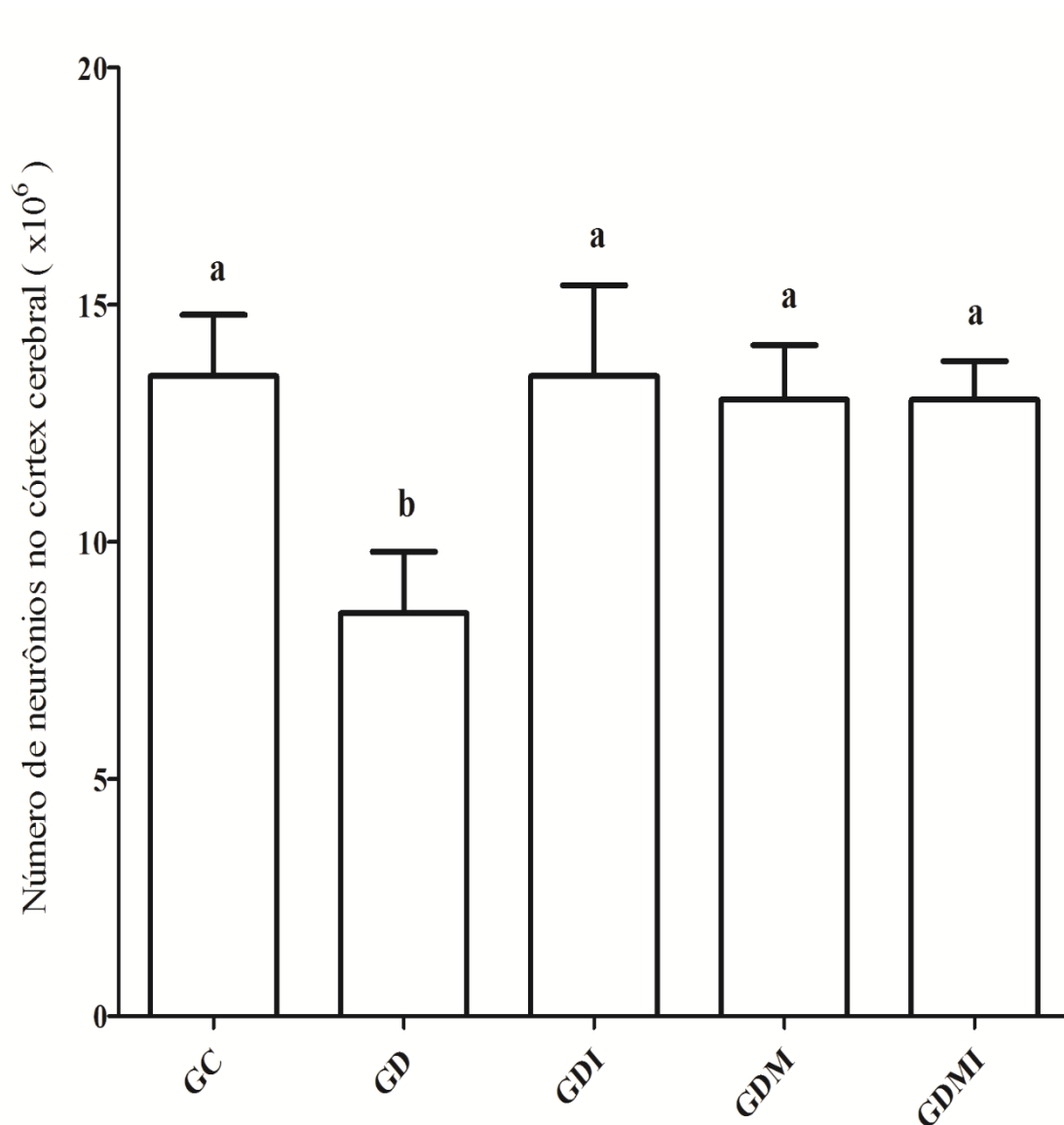


Figura 4. Estimativa do número de neurônios do córtex cerebral dos animais dos grupos experimentais. GC - grupo controle; GD - grupo diabético; GDI - grupo diabético tratado com insulina; GDM - grupo diabético tratado com melatonina; GDMI - grupo diabético tratado com melatonina/insulina. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Dunn ($p < 0,05$).

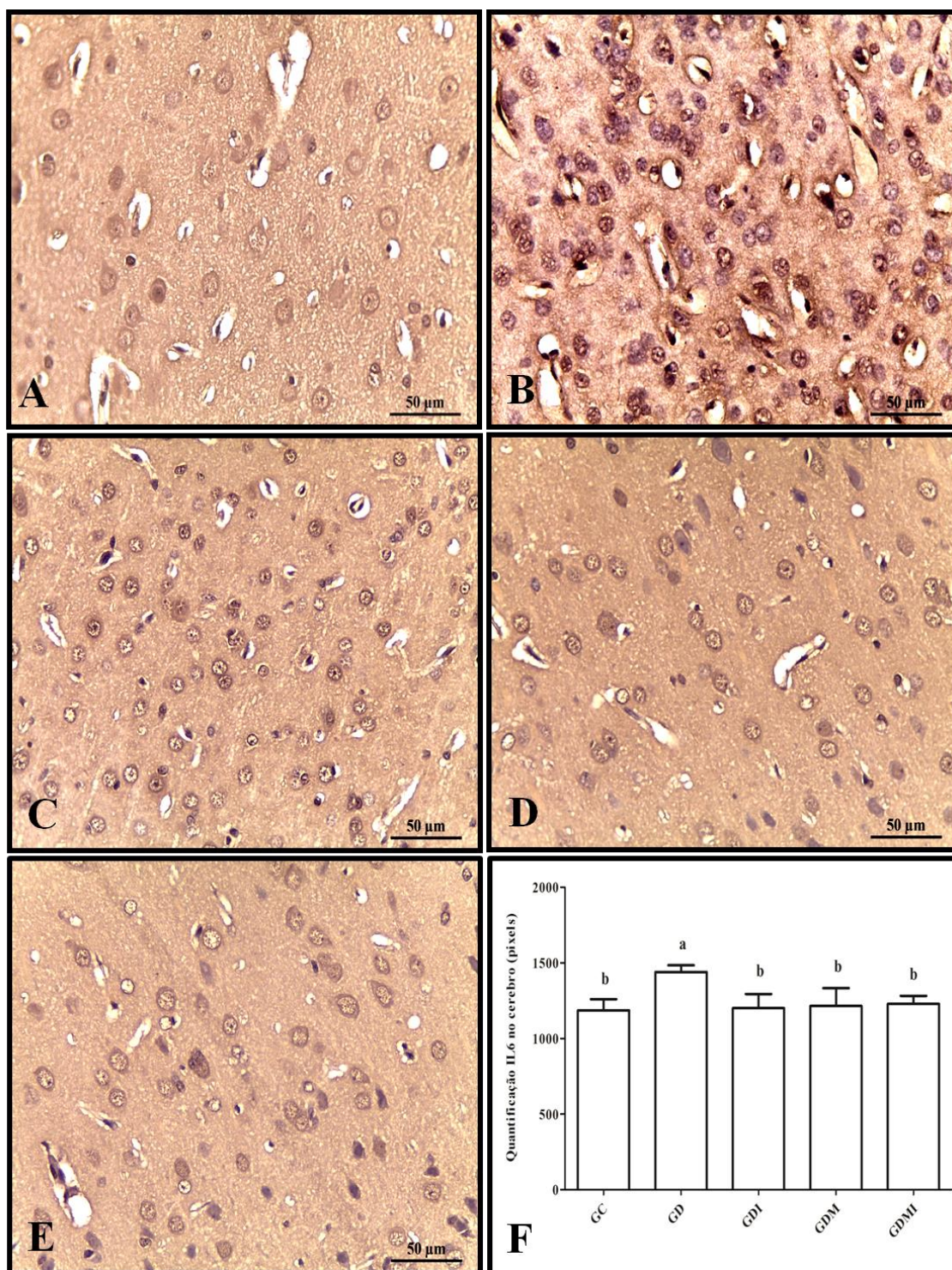


Figura 5. Imunohistoquímica para IL-6 no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

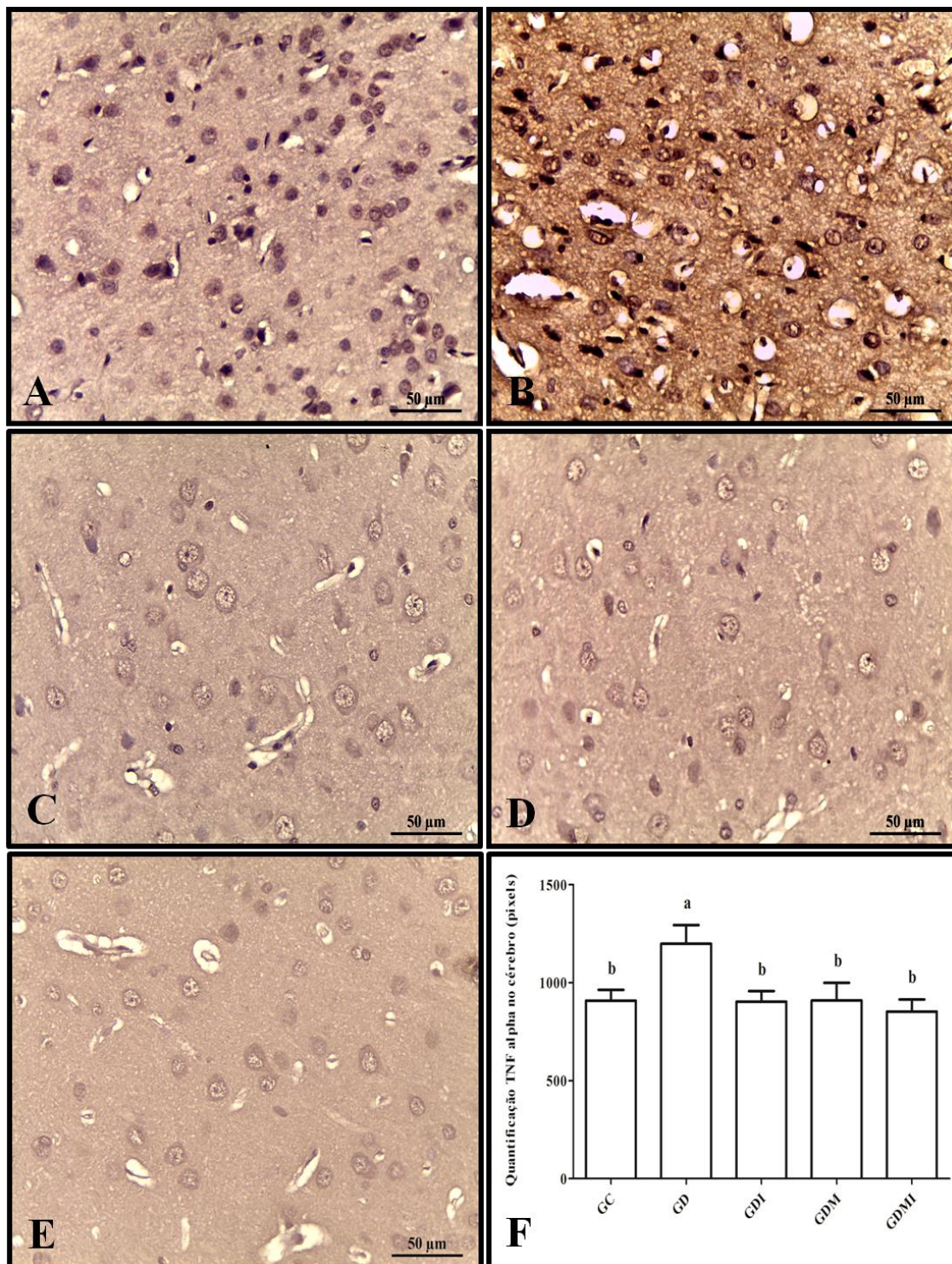


Figura 6. Imunohistoquímica para TNF- α no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

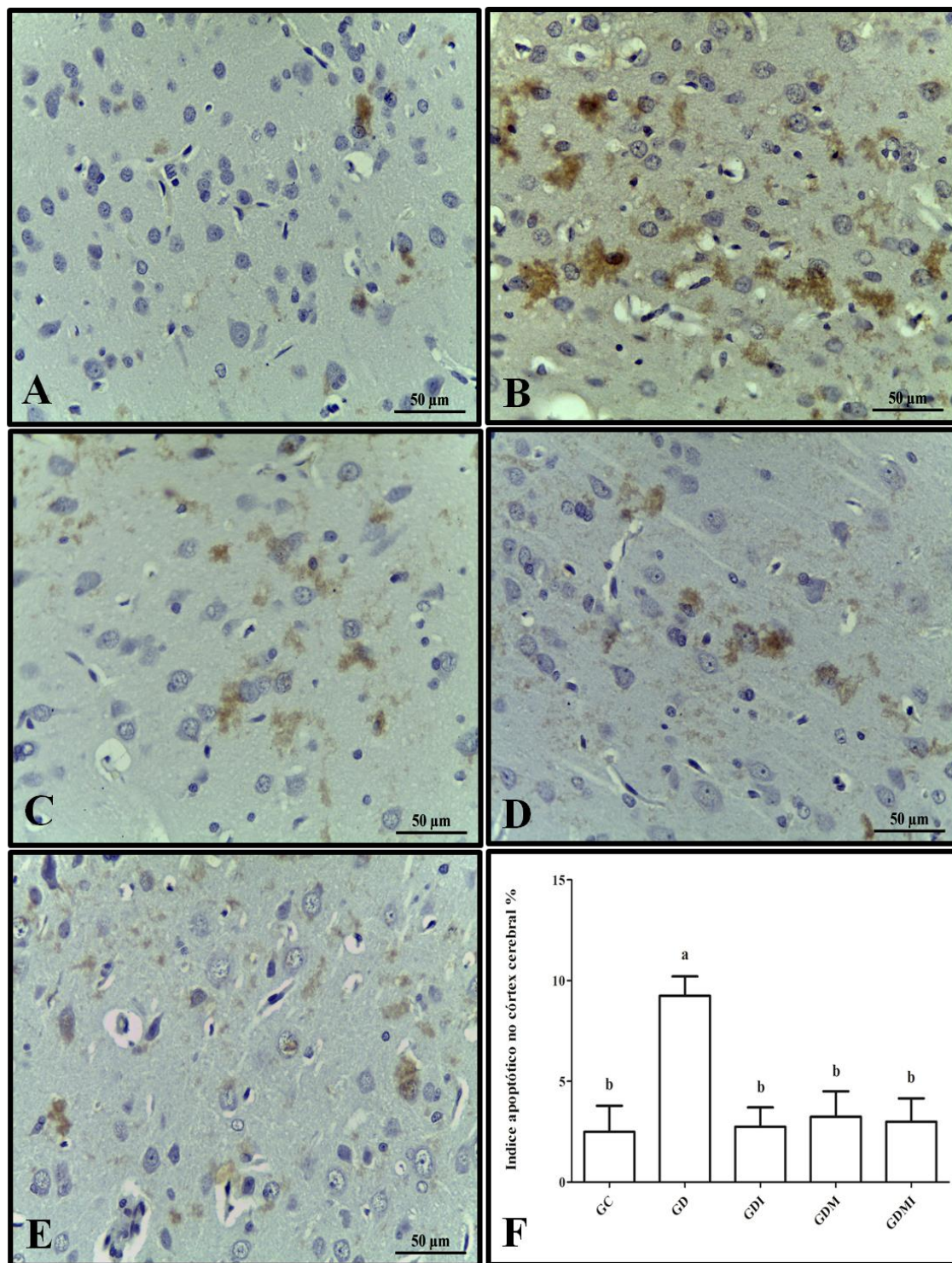


Figura 7. Imunohistoquímica para apoptose no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Índice apoptótico. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Dunrtn ($p < 0,05$).