



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

ÉRIQUE RICARDO ALVES

**MECANISMOS DE AÇÃO DA MELATONINA SOBRE OS TESTÍCULOS DE
RATOS DIABÉTICOS A NÍVEL CELULAR E IMUNOHISTOQUÍMICO**

**RECIFE
2019**

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

ÉRIQUE RICARDO ALVES

**MECANISMOS DE AÇÃO DA MELATONINA SOBRE OS TESTÍCULOS DE
RATOS DIABÉTICOS A NÍVEL CELULAR E IMUNOHISTOQUÍMICO**

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.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientador:

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

**RECIFE
2019**

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

A474m Alves, Érique Ricardo.
Mecanismos de ação da melatonina sobre os testículos de ratos diabéticos a nível celular e imunohistoquímico / Érique Ricardo Alves. – Recife, 2019.
79 f.: il.

Orientador(a): Valéria Wanderley Teixeira.

Coorientador(a): Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, Valdemiro Amaro da Silva Junior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. Diabetes 2. Testículo 3. Melatonina 4. Stress oxidativo 5. Imunohistoquímica
6. Ratos I. Teixeira, Valéria Wanderley, orient. II. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho,
coorient. III. Título

CDD 500

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

ÉRIQUE RICARDO ALVES

**MECANISMOS DE AÇÃO DA MELATONINA SOBRE OS TESTÍCULOS DE
RATOS DIABÉTICOS A NÍVEL CELULAR E IMUNOHISTOQUÍMICO**

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

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira (Orientadora)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira – (DMFA/ UFRPE)

Dr^a. Ismaela Maria Ferreira de Melo – (DMFA/ UFRPE)

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior – (DMV/ UFRPE)

AGRADECIMENTOS

Antigamente me perguntava como Deus pode agir e interferir de forma tão material e pessoal nas nossas vidas. Hoje sei a resposta: na maioria das vezes ele utiliza pessoas como instrumento de Sua vontade e como providência para cumprir seus planos. Todas as pessoas que irei citar nestes agradecimentos foram e são de certa forma instrumento divino, para que hoje pudesse terminar esse trabalho.

Primeiramente quero agradecer a Deus pela sua misericórdia e providência. Por me dar paz e coragem para prosseguir em toda essa empreitada. Pelo seu amor e graça, pois sem Deus e sem sua permissão nada seria feito. Obrigado Senhor por cuidar de mim em cada situação. Agradecer também minha mãe Maria, pelo apoio de todas as formas e pelo amor incondicional, que me serviram como esteio. Quero agradecer também a minha namorada Joásia pela cumplicidade, paciência e ajuda.

Quero dar gratidão a todos os familiares e amigos que acreditaram e me ajudam de forma direta e indireta.

Agradecendo a todos sem exceção, do laboratório de histologia pela ajuda, paciência e compreensão, pois agiram sempre com muita gentileza comigo. Nesse ínterim quero agradecer em especial a Cíntia, Ismaela, Carol, Aline, Clóvis, Marina, Yuri, Rebeca, Glaucilane, Hilton, Vanessa, Matheus. Além desses quero também agradecer a Welma pela ajuda.

Quero também agradecer ao professor Valdemiro Amaro da Silva Junior pelo tempo desprendido, pela compreensão, confiança e por sempre se mostrar solícito a ajudar em todos os momentos que precisei. Quero agradecer também a sua orientanda Gisele pela ajuda. Agradeço também neste momento ao Professor Lêucio Duarte Vieira Filho da UFRPE pela ajuda e confiança de ceder seu laboratório e tempo para finalizar esse trabalho.

Quero mostrar minha gratidão também à professora Valéria Wanderley Teixeira pelo tempo desprendido na realização deste trabalho e por sempre agir comigo com uma profícua honestidade e afabilidade, sempre me estimulando! Quero também agradecer ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira por sua paciência e ajuda.

Quero agradecer também a FACEPE e Universidade Federal Rural de Pernambuco pelo apoio, como também ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal e seus coordenadores Pro^a Dr^a Tatiana Souza Porto e ao Prof^o Dr^o Rinaldo Aparecido Mota pelo empenho e dedicação para nossa formação como pesquisadores e docentes. Ademais agradeço ajuda a Renato, André bem como também ao coordenador do Biotério Prof^o Dr^o Anísio Francisco Soares. E agradeço também a Edna Maria Edna Gomes de Barros técnica do DMFA pela ajuda e paciência.

RESUMO

O diabetes mellitus é uma desordem hiperglicemiante considerada caso de saúde pública. Podendo afetar diversos órgãos inclusive do sistema reprodutor masculino como os testículos, neste pode causar diversas distúrbios como baixa produção hormonal, espermática, diminuição de peso e anormalidades morfométricas teciduais. Levando a prejuízos a saúde do homem. Esta doença está associada com o aumento da inflamação e estresse oxidativo. Atualmente vem se destacando o uso de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias como a melatonina. Este hormônio pineal que está associado com a regulação do sono vêm sendo usado em diversas patologias como alternativa terapêutica. Nesse sentido o objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso da melatonina em ratos diabéticos sobre os testículos a nível celular e imunohistoquímico. Foram utilizados 50 ratos albinos divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução ao diabetes; GD: ratos induzidos ao diabetes e tratados com placebo; GDI: ratos induzidos ao diabetes e após confirmação tratados com insulina GDM: ratos induzidos ao diabetes e após confirmação tratados com melatonina e GDMS: ratos induzidos ao diabetes e simultaneamente tratados com melatonina. A melatonina foi administrada na dosagem de 10 mg/kg na água, todo dia durante 20 dias pela noite. O diabetes foi induzido pela estreptozotocina (60 mg/kg) e confirmada após cinco dias da indução. A insulina foi administrada em 5 U/dia durante 20 dias. Os testículos foram submetidos à análise histopatológica, morfométrica, imunohistoquímica e estresse oxidativo tecidual. Os resultados demonstraram que a melatonina de forma simultânea conseguiu diminuir índice glicêmico, além de normalizar parâmetros morfométricos alterados pelo diabetes. Ademais a melatonina não interferiu em padrões de peso corporal nem testicular, nem nos níveis de TBARS inclusive de animais diabéticos. Ainda atuou aumentando níveis de receptor de andrógenos, testosterona total e glutathione reduzida (GSH). E diminuiu níveis de IL-6 e TNF- α . Assim sendo conclui-se que a melatonina atuou diminuindo parâmetros morfométricos, glicêmicos, inflamatórios associados ao diabetes. Além de atuar regulando a balança do estresse oxidativo através do aumento da expressão de enzimas antioxidantes e regulando os níveis de testosterona total e receptor de andrógenos. Mostrando sua capacidade como agente terapêutico no diabetes.

Palavras-chave: Diabetes, imunohistoquímica, melatonina, ratos, testículo, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a hyperglycaemic disorder considered a public health case. It can affect several organs including the male reproductive system such as the testicles, in this one can cause diverse disorders like low hormonal production, spermatozoa, weight loss and tissue morphometric abnormalities. Leading to damage to the health of man. This disease is associated in its histopathology with the increase of inflammation and oxidative stress. Nowadays, the use of antioxidant and anti-inflammatory molecules such as melatonin has been highlighted. This pineal hormone that is associated with sleep regulation has been used in several pathologies as a therapeutic alternative. In this sense, the objective of the present work was to evaluate the use of melatonin in diabetic rats on the testes at the cellular and immunohistochemical level. Fifty albino rats were divided into the following groups: GC: rats without diabetes induction; GD: rats induced to diabetes and treated with placebo; GDI: diabetes-induced and post-confirmation rats treated with GDM insulin: diabetes-induced and post-confirmation mice treated with melatonin and GDMS: diabetes-induced mice and simultaneously treated with melatonin. Melatonin was administered at a dosage of 10 mg / kg in water, every day for 20 days at night. Diabetes was induced by streptozotocin (60 mg / kg) and confirmed after the fifth day of induction. Insulin was administered at 5 U / day for 20 days. The testes were submitted to histopathological, morphometric, immunohistochemical and tissue oxidative stress analysis. The results demonstrated that melatonin simultaneously was able to decrease glycemic index, besides normalizing morphometric parameters altered by diabetes. In addition, melatonin did not alter did not interfere in body or testicular weight standards nor in TBARS levels including diabetic animals. It also increased levels of androgen receptor, total testosterone and reduced glutathione (GSH). E decreased levels of IL-6 and TNF- α . Thus, it was concluded that melatonin acted to decrease morphometric, glycemic and inflammatory parameters associated with diabetes. In addition to acting regulate the balance of oxidative stress by increasing the expression of antioxidant enzymes and regulating levels of total testosterone and androgen receptor. Showing their capacity as a therapeutic agent in diabetes.

Key words: Diabetes, immunohistochemistry, melatonin, rats, testicles, oxidative stress .

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 DIABETES MELLITUS.....	16
2.2 SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	19
2.3 ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E SEXUAIS NO DIABETES.....	22
2.4 DIABETES MELLITUS E ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
2.5 MELATONINA.....	26
2.6 MELATONINA, DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	34
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

CAPÍTULO II

Mecanismos de ação da melatonina sobre os testículos de ratos diabéticos a nível celular e imunohistoquímico	48
1. INTRODUÇÃO.....	51
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3. RESULTADOS.....	59
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	66
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
5. ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Componentes do aparelho reprodutor masculino. O testículo e o epidídimo estão representados em aumento diferente do das outras estruturas.....20
- Figura 2.** Aldose redutase e a via dos polióis. A redução da aldose reduz aldeídos gerados por espécies reativas de oxigênio (EROs) a álcoois inativos, e glicose em sorbitol, usando NADPH como co-fator. Nas células onde a atividade redutase de aldoses é suficiente para reduzir a glutathiona reduzida (GSH), o estresse oxidativo é aumentado. A sorbitol desidrogenase (SDH) oxida o sorbitol em frutose usando NAD⁺ como co-fator.....25
- Figura 3.** Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia induzida. ET-1 = endotelina-1; NO = óxido nítrico; VEGF = fator de crescimento celular derivado do endotélio; TGF- β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio 1; NF κ B = fator nuclear κ -B; NAD(P) = H forma reduzida de NADP⁺; ROS = espécies reativas de oxigênio26
- Figura 4.** Estrutura química da molécula da melatonina.....27
- Figura 5.** Formação da melatonina, com suas principais vias de catabolismo indólico e interconversões entre indolominas bioativas. CYP, isoformas do citocromo P₄₅₀ (hidroxilases e demetilases).....30

Capítulo II

Figura 1. Níveis de glicose (mg/dl). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....71

Figura 2. Peso dos animais dos grupos experimentais (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....71

Figura 3. Peso dos testículos dos grupos experimentais (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....72

Figura 4. Altura média do epitélio testicular (A) e Diâmetro tubular médio testicular (B) (μm). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....72

Figura 5. Índice organossomático (%). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....73

Figura 6. Análise do Estresse Oxidativo. (A) Níveis de TBARS testicular (nm/mg); (B) Níveis de glutathiona (GSH) testicular (nm/mg). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....73

Figura 7. Níveis séricos de testosterona total no décimo (A) e vigésimo (B) dia de tratamento dos animais dos grupos experimentais (ng/mL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....74

Figura 8. Secção transversal dos túbulos seminíferos de ratos Wistar adultos dos grupos experimentais corado com hematoxilina-floxina. A) GC- Grupo controle, B) GD- Grupo diabético; C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina; D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina; E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea. Observar túbulos seminíferos (estrela); células da linhagem espermatogênica (seta) e interstício (asterisco).....75

Figura 9. Imunohistoquímica para IL-6 nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina. D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom da IL-6. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....76

Figura 10. Imunohistoquímica para TNF- α nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom do TNF- α . *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....77

Figura 11. Imunohistoquímica para receptor de andrógenos nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom do receptor de andrógenos. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).....78

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é um processo patológico de caráter crônico e metabólico, onde há um desnivelamento nos níveis glicêmicos do organismo (DAVID et al., 2015). Nessa desordem o pâncreas pode não produzir insulina suficiente como também pode sintetizá-la de forma ineficaz (DAVID et al., 2015), ou ainda pode haver resistência à insulina (KUZUYA et al., 2002) levando a um aumento da glicose (OGURTSOVA et al., 2017). O diabetes em conjunto com suas complicações é notavelmente a principal causa de morte na maior parte dos países (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

O Brasil ocupa a quarta posição entre os países com maior número de adultos diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Outros dados epidemiológicos apontam que em 2017 havia mais de 400 milhões de pessoas diabéticas no mundo, e que a cada 8 segundo uma pessoa morre no mundo por essa doença. Os homens são mais afetados pelo diabetes (221 milhões) do que as mulheres (204,9 milhões).

Os principais tipos de diabetes são o tipo I (DMI) que é uma doença auto-imune, que ocorre quando o organismo começa a destruir as suas próprias células beta produtoras de insulina e o diabetes tipo II (DMII) que é o diabetes mais comum, tem como causa principal a resistência a insulina ou ocorre uma produção inadequada da mesma (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; EVANS et al., 2000). E umas das formas mais utilizadas para estudar esse distúrbio, é através da indução experimental.

Existem atualmente formas experimentais de indução para avaliar as complicações diabéticas. O mais utilizado é a indução pela estreptozotocina (STZ) que destrói as células beta pancreáticas gerando o diabetes tipo I (AKBARZADEH et al., 2007; FURMAN, 2001; XU et al., 2014a). Diversas complicações desse distúrbio já são bem relatadas na literatura alguma delas incluem doenças cardiovasculares, disfunção endotelial, nefropatia diabética, retinopatia e neuropatia (BERTOLUCI et

al., 2008; KUZUYA et al., 2002; SCHEFFEL et al., 2004), além de distúrbios no sistema reprodutor masculino (RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008).

Nesse ínterim já é notório o quão nocivo o diabetes é para o sistema reprodutor masculino (LUE et al., 2017a; XU et al., 2014a). Isso faz com que cerca de 90% dos pacientes do sexo masculino com diabetes tem algum nível de distúrbio na função sexual (JIANG, 1996; PORTO et al., 2011). Um dos órgãos que pode ser mais afetado por essa doença é o testículo, neste pode haver danos as células de Leydig, levando a diminuição na quantidade de testosterona (LA VIGNERA et al., 2009) o que pode acarretar na atrofia de diversos órgãos desse sistema (RIBEIRO et al., 2006). Diversas outras anormalidades nesse sistema também são referidas, como diminuição do desejo sexual (ZIAEI-RAD; VAHDANINIA; MONTAZERI, 2010), dos espermatozoides (OMOLAOYE; SKOSANA; DU PLESSIS, 2018) e da libido (ALVES et al., 2013). Além de alterações no epidídimo (SOUDAMANI; MALINI; BALASUBRAMANIAN, 2005), nas vesículas seminais (LA VIGNERA et al., 2011) e na próstata (PORTO et al., 2011).

O diabetes também é uma doença inflamatória. Onde há um aumento de marcadores inflamatórios como o TNF- α e IL-6, IL-8 e IL-1, que estão associados com a progressão dessa doença (BRADSHAW et al., 2009; CHEN et al., 2017; COSENTINO; EGIDY ASSENZA, 2004; DOGAN et al., 2006; DOGANAY et al., 2002; ERBAĞCI et al., 2001; HUSSAIN et al., 1996). Além disso, outros fatores como o estresse oxidativo, estão associados na sua fisiopatologia (BROWNLEE, 2001a).

O estresse oxidativo se caracteriza por um desbalanceamento entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003). O excesso de radicais livres ocasionados pelo diabetes é o principal componente para distúrbios testiculares (RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008). Atualmente vem se destacando o uso de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias como a melatonina.

A melatonina é uma indolamina produzida principalmente pela glândula pineal (AXELROD, 1974; COMMENTZ; HELMKE, 1995). Entre suas principais funções estão: determinante do ciclo sono-vigília, da atividade reprodutora e metabólica de diversas espécies (MAGANHIN et al., 2008). Já é manifesto que esse hormônio possui atividade antioxidante (GOBBO et al., 2015; REITER et al., 2016; TEIXEIRA,

2003; ZHANG; ZHANG, 2014) e também atua como anti-inflamatória podendo evitar complicações crônicas da inflamação (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010).

Muitos homens vêm perdendo sua saúde sexual e mental pelo diabetes e isso pode impactar a capacidade reprodutiva desse gênero (FAIRBURN; MCCULLOCH; WU, 1982; JIANG, 1996). Levando-se em consideração que existem poucos tratamentos na medicina reprodutiva especificamente adaptados para pacientes diabético (BACCETTI et al., 2002) e que tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica para as complicações relacionadas à diabetes, além disso a melatonina vem mostrando efeitos promissores para amenizar as complicações do diabetes (BOJUNGA et al., 2004; JIANG et al., 2016; REZVANFAR et al., 2017) e pode ser considerada como uma ferramenta terapêutica em potencial para a melhora da saúde humana (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010) graças principalmente, a sua eficiente e potente ação antioxidante (REITER et al., 2016), Assim, a presente pesquisa visou investigar a ação da melatonina sobre testículos de ratos diabéticos, como um possível tratamento para minimizar ou inibir os efeitos prejudiciais provocados por essa patologia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DIABETES MELLITUS

O DM é caracterizada como uma desordem crônica metabólica, ocasionada por um desbalanceamento nos níveis glicêmicos do organismo (DAVID et al., 2015) levando a hiperglicemia. Nessa doença o pâncreas pode não produzir insulina ou a insulina é sintetizada de forma ineficaz (DAVID et al., 2015), ou ainda pode haver resistência à insulina (KUZUYA et al., 2002). O diabetes em conjunto com suas complicações são notavelmente as principais causas de morte na maior parte dos países (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Em um amplo levantamento feito pela INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (2017) mostrou que em 2017 havia 425 milhões de pessoas com diabetes em todo mundo. Mostrando assim que 1 em cada 11 adultos desenvolve essa patologia, e que o gasto com a mesma, principalmente com suas complicações são astronômicos, chegando a 12% das despesas em saúde no mundo. Além disso,

foi visto que o índice de gestantes diabéticas também é preocupante onde 1 em cada 6 nascidos são afetados por esse distúrbio. Nesse mesmo relatório um número assustador ainda foi mostrado que a cada 8 segundos uma pessoa morre por essa doença no mundo. Isso foi equivalente a 4 milhões de pessoas mortas em 2017 por essa moléstia, correspondendo a 10,7% da mortalidade global de todas as causas.

Os dados mostram mais: se estipula que em 2045 haja 629 milhões de pessoas com diabetes. Além do mais, foi feito um levantamento por gênero, e tornou-se evidente que os homens sofrem mais com essa doença, participando com 221 milhões contra 204,9 milhões de mulheres portadoras desse problema. Isso corresponde com uma prevalência de 9,1% para homens e de 8,4% para mulheres nas idades de 20-79 anos para ambos.

Ainda segundo a mesma fonte supracitada é notória a posição de destaque do Brasil em vários parâmetros do estudo. Ele ocupa a terceira posição de índice de crianças com diabetes tipo I (0 a 14 anos) com 30.900 crianças. O Brasil só perde para os Estados Unidos que ocupa o primeiro lugar (com 84.100 crianças diabéticas) e para a Índia que ocupa o segundo lugar (com 70.200 crianças diabéticas). Além disso, o Brasil ocupa a quarta posição entre os países com maior número de adultos diabéticos (14,3 milhões) e a quinta posição com gastos com saúde (USD 22 milhões) e ainda contribui com 130.700 óbitos por esse distúrbio. Mostrando assim uma forte tendência do aumento de casos de diabetes e mortalidade pela mesma, em países em desenvolvimento.

Os dois principais tipos de diabetes são: o diabetes tipo I (DMI) que é caracterizada como uma reação autoimune onde o sistema imunológico do corpo ataca as células beta produtoras de insulina nas ilhotas pancreáticas. Como resultado, o corpo produz nenhuma ou pouca insulina sendo assim uma deficiência relativa ou absoluta de insulina. As causas deste processo destrutivo não são totalmente entendidas, mas uma combinação de suscetibilidade genética e gatilhos ambientais, tais como infecção viral, toxinas e alguns fatores dietéticos influem nessa patogênese (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). A doença pode se desenvolver em qualquer idade, mas o tipo I ocorre com mais frequência em crianças e adolescentes. Pessoas com este tipo de diabetes precisam de injeções diárias de insulina, monitoramento regular e manutenção de uma dieta saudável, a fim de manter um nível de glicose no intervalo adequado, porém sem insulina não

seriam capazes de sobreviver. Além disso, esses cuidados podem impedir as complicações associadas a essa doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Já o tipo II (DMII) é o mais comum. Neste a hiperglicemia é uma consequência de uma produção inadequada de insulina e incapacidade do corpo para responder plenamente a esta, isso pode ser definido como resistência à insulina. O DMII é mais comumente visto em adultos mais velhos, mas é cada vez mais visto em crianças, adolescentes e adultos mais jovens devido ao aumento dos níveis de obesidade, inatividade física e má alimentação (EVANS et al., 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Os sintomas do DMII podem ser idênticos às do tipo I, incluindo em particular, aumento da sede, micção frequente, cansaço, feridas de cicatrização lenta, recorrentes infecções e formigamento ou dormência nas mãos e pés. Como resultado, muitas vezes há um longo período para a detecção inicial e isso faz com que boa parte dos casos não são diagnosticados porque podem permanecer sem sintomas por muitos anos. E quando descoberto já se está em um quadro avançado de suas complicações (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). As causas da DMII não são completamente entendidas, mas há uma forte ligação com o sobrepeso e obesidade e com o aumento da idade, bem como com etnia e história familiar. Alguns fatores de risco relativos importantes incluem: obesidade, má alimentação e nutrição, inatividade, pré-diabetes ou tolerância prejudicada pela glicemia, tabagismo e história pregressa de diabetes com exposição do feto a sangue com elevada glicose durante a gravidez (IMAMURA et al., 2015; MALIK et al., 2010).

Atualmente os modelos para indução experimental do diabetes já estão bem estabelecidos. Os mais utilizados são através principalmente de dois fármacos: o aloxano e a estreptozotocina. Os dois com potencial de gerar o diabetes tipo I. Porém o modelo induzido por estreptozotocina é um dos mais utilizados e de sucesso para se estudar os efeitos dessa doença em ratos e camundongos (AKBARZADEH et al., 2007; FURMAN, 2001; XU et al., 2014b). A estreptozotocina (STZ) é um derivado da nitrosoureia monofuncional, com atividade antibiótica de amplo espectro. STZ é um potente agente alquilante conhecido por metilar diretamente o DNA (HERR; JAHNKE; ARGOUEDELIS, 1967). Usando 60 mg/kg de dose dessa droga em ratos, pode começar um processo auto-imune que resulta na

destruição das células beta das ilhotas de Langerhans. Esse efeito ocorre graças ao potencial dessa droga de aumentar o estresse oxidativo, principalmente nas ilhotas pancreáticas. A dose de 60 mg/kg resulta na toxicidade das células beta com surgimento de diabetes clínico dentro de poucos dias (WEISS, 1982). O atrativo desse modelo de indução está no seu baixo custo em relação a outros métodos de indução (FURMAN, 2001).

Tanto o DMI quanto o DMII têm um cunho inflamatório muito significativo, inclusive na sua patogênese. Isso foi demonstrado pelo aumento tecidual e plasmático de marcadores da resposta inflamatória, como principalmente o TNF- α e IL-6, IL-8 e IL-1. No diabetes tipo I esse aumento foi mediado justamente por uma modulação imunológica associada a doenças autoimunes e desempenha um papel significativo na progressão dessa doença (BRADSHAW et al., 2009; CHEN et al., 2017; COSENTINO; EGIDY ASSENZA, 2004; DOGAN et al., 2006). E, além disso, acredita-se atualmente que o estresse oxidativo tenha papel determinante na patogênese das complicações do diabetes (BROWNLEE, 2001b; REIS et al., 2008).

O grande problema do diabetes e o que a torna de certa forma incapacitante são suas complicações. As mais frequentes são os distúrbios cardiovasculares, como cardiopatia isquêmica, doença vascular periférica (SCHEFFEL et al., 2004) e disfunção endotelial (BERTOLUCI et al., 2008); moléstias renais (principalmente que afetam os glomérulos) podem levar a nefropatia diabética (SUN et al., 2013); retinopatia e neuropatia, e além disso a diabetes leva ao agravamento da arteriosclerose, aumentando assim os riscos envolvidos no surgimento do infarto do miocárdio, infarto cerebral e doença arterial oclusiva das extremidades inferiores. Essas complicações são as primeiras causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos (KUZUYA et al., 2002). Além dessas, outras não tão propaladas, porém já bem conhecidos são os distúrbios no sistema reprodutor masculino (RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008).

2.2. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO

O sistema reprodutor masculino é responsável pelo processo fundamental da evolução que é a perpetuação da espécie. Isso ocorre de uma forma geral graças à

atividade sexual que por sua vez envolve uma interação entre componentes fisiológicos, psicológicos e comportamentais (LEVIN; RILEY, 2007).

Este sistema é formado pelos testículos, epidídimos, canais deferentes, ducto ejaculador, uretra e pelas glândulas acessórias. Estas incluem as vesículas seminais, a próstata e glândulas uretrais (Figura 3) (GUYTON; HALL, 2011) e em alguns roedores existe também a glândula de coagulação (ESPOSITO et al., 1996).

Segundo Guyton; Hall (2011):

O testículo é composto em humanos por até 900 túbulos seminíferos convolutos, onde é formado o esperma; cada um tem, em média, mais de 1 metro de comprimento. O esperma, então, é lançado no epidídimo, outro tubo convoluto de, aproximadamente, 6 metros de comprimento. O epidídimo conduz ao canal deferente, que se alarga na ampola do canal deferente, imediatamente antes do canal entrar no corpo da glândula prostática.

Duas vesículas seminais, uma de cada lado da próstata, desembocam na terminação prostática da ampola e os conteúdos da ampola e das vesículas seminais passam para o ducto ejaculatório e são conduzidos, através do corpo da glândula prostática, e, então, desaguando na uretra interna. Os ductos prostáticos recebem o conteúdo da glândula prostática e o conduzem para o ducto ejaculatório e, daí, para a uretra prostática. Finalmente, a uretra é o último elo de conexão dos testículos com o exterior. A uretra contém muco proveniente de grande número de pequenas glândulas uretrais, localizadas em toda sua extensão e, em maior quantidade, das glândulas bulbouretrais (glândulas de Cowper) localizadas próximas da origem da uretra (Figura 3) (GUYTON; HALL, 2011, p. 1025)

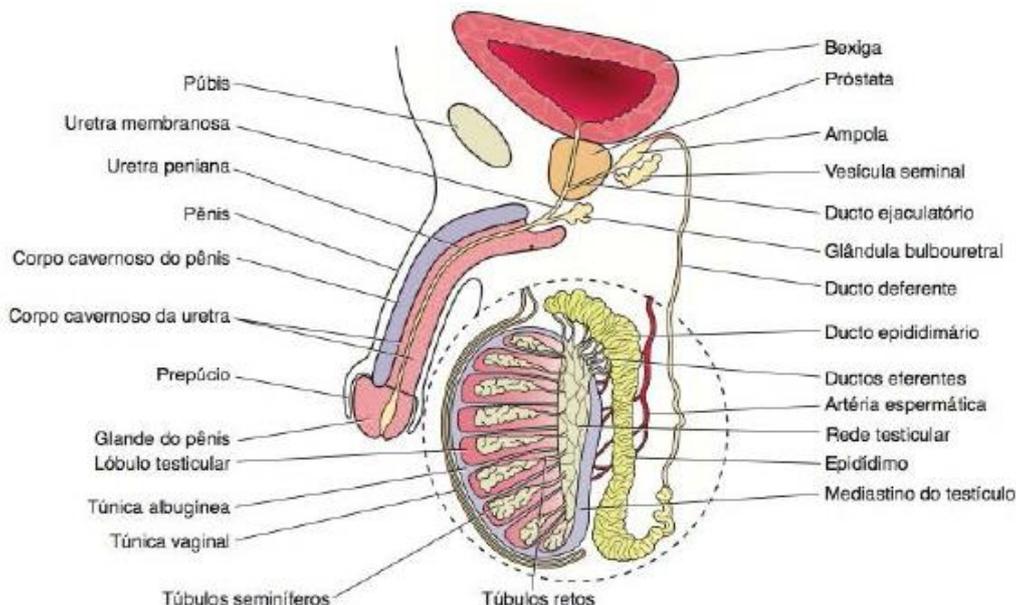


Figura 1. Componentes do aparelho reprodutor masculino. O testículo e o epidídimo estão representados em aumento diferente do das outras estruturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A fisiologia das atividades esteroidogênicas e espermatogênicas dos testículos são mediadas pela interação hormonal entre o hipotálamo, a adeno-hipófise e as células gonadais (células de Sertoli, espermatogênicas e de Leydig). A adenohipófise sintetiza três hormônios envolvidos nesse processo: o hormônio luteinizante (LH) que, no homem, algumas vezes, é referido como hormônio estimulante das células intersticiais; hormônio foliculoestimulante (FSH) e prolactina (PRL). Em resposta à liberação de LH pela hipófise, as células de Leydig produzem quantidades crescentes de testosterona. A PRL age em combinação com o LH para aumentar a atividade esteroidogênica das células de Leydig. Como existem receptores de FSH e de testosterona nas células de Sertoli, essas células são ditas como reguladores primários da espermatogênese (ROSS; PAWLINA, 2012).

Os testículos têm uma função endócrina essencial tanto para o próprio sistema reprodutor masculino quanto para os outros tecidos do corpo. Neste órgão é produzida a testosterona (95% de toda testosterona produzida pelo organismo), um andrógeno imprescindível para a espermatogênese; desempenham um importante papel no desenvolvimento embrionário masculino e no fenótipo masculino do feto, e é responsável pelo dimorfismo sexual. Ademais os níveis periféricos de testosterona têm efeito na diferenciação do sistema nervoso central (SNC) e do aparelho genital e do sistema de ductos excretores genitais; crescimento e manutenção das características sexuais secundárias (como barba, distribuição masculina dos pelos púbicos e voz em tom grave); crescimento e manutenção das glândulas sexuais acessórias (vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais), sistema de ductos excretores genitais e da genitália externa (principalmente subprodutos da conversão da testosterona em diidrotestosterona (DHT)); processos metabólicos anabólicos e gerais, incluindo crescimento dos ossos e dos músculos esqueléticos, distribuição da gordura subcutânea e função renal; e por fim tem papel modulador no comportamento sexual, incluindo a libido (GUYTON; HALL, 2011; HEINDEL; TREINEN, 1989; ROSS; PAWLINA, 2012).

Atualmente sabe-se que o diabetes pode impactar negativamente esse sistema, sendo referido como uma complicação da mesma, atuando assim na saúde física e mental do homem (LUE et al., 2017; SCHIAVI et al., 1993; XU et al., 2014).

2.3. ALTERAÇÕES REPRODUTIVAS E SEXUAIS NO DIABETES

Cerca de 90% dos pacientes do sexo masculino com diabetes tem algum nível de distúrbio na função sexual, incluindo diminuição da libido, impotência e infertilidade graças principalmente às alterações nos testículos em modelos experimentais animais (JIANG, 1996; PORTO et al., 2011)

As disfunções sexuais são uma das complicações mais comum em pessoas com diabetes (ALVES et al., 2013; LUE et al., 2017; SCHIAVI et al., 1993). Ela é definida como incapacidade recorrente de obter e manter uma ereção que permita atividade sexual satisfatória (NASCIMENTO; GIAMI; RUSSO, 2009; SARRIS et al., 2016) sendo uma expressão sintomatológica de patologias isoladas ou associadas (MOURA; CERESÉR, 2002). Sua incidência em homens diabéticos é três vezes maior do que na população em geral (LUE et al., 2017; PENSON et al., 2003). A fisiopatologia da disfunção erétil (DE) na diabetes é composta por muitos fatores, como danos vasculares, hormonais e neurológicos (LUE et al., 2017b; SEFTEL et al., 1997).

Outros tipos de disfunções sexuais relacionados a essa doença são referidos na literatura. Como em um estudo feito por Ziaei-rad; Vahdaninia; Montazeri (2010), onde foi observada uma diminuição do desejo sexual da função orgástica e da satisfação sexual. Em outro estudo, Alves et al (2013) demonstraram outros tipos de distúrbios sexuais como ejaculação retrógrada e perda de libido. Além dessas alterações de cunho sexual, há relatos de outras modificações em parâmetros de cunho reprodutivos que estão relacionados com o aumento da infertilidade (ALVES et al., 2013; SHRILATHA, 2007; SIMAS et al., 2017).

Em relação às alterações nos parâmetros reprodutivos, Omolaoye; Skosana; Du Plessis (2018) observaram diminuição do número de espermatozoides e ausência de espermatogênese como efeito direto da hiperglicemia. Falência espermatogênica e diminuição do número de espermatozoides viáveis também foram relatados (ALVES et al., 2013; MARESCH et al., 2017). Outros achados também são muito referidos na literatura como diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, da produção diária de esperma e da motilidade dos espermatozoides, vacuolização intra-epitelial, e modificações morfológicas dos espermatozoides (SIMAS et al.,

2017), bem como espessamento da membrana basal (GUNELI et al., 2008) e apoptose de células da linhagem espermatogênica e de Sertoli (LONG et al., 2018).

Como demonstrado anteriormente à fisiologia do sistema reprodutor masculino (SRP) é altamente dependente de andrógenos. Estudos já comprovam que células de Leydig, são altamente afetadas pelo DM, levando a diminuição na quantidade de testosterona e conseqüente hipogonadismo (LA VIGNERA et al., 2009). Essa diminuição pode acarretar na atrofia e conseqüente diminuição do peso de órgãos do sistema reprodutor masculino (RIBEIRO et al., 2006).

Ademais essa enfermidade é um dos fatores patogênicos que mais influenciam (junto com o aumento da idade, hipercolesterolemia e anemia) para uma maior predisposição à deficiência androgênica (KÖHLER et al., 2008). Nesse ínterim o hipogonadismo que é muito comum em pacientes diabéticos pode contribuir significativamente para alterações no humor, libido, composição corporal e densidade óssea, bem como pode ser um fator preponderante para a patogênese da disfunção erétil, trazendo assim prejuízos à saúde do homem (HIJAZI; BETANCOURT-ALBRECHT; CUNNINGHAM, 2004).

O diabetes junto com o estresse oxidativo também afeta negativamente o sistema reprodutor masculino, sendo o estresse oxidativo o principal componente para os distúrbios nesse sistema (RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008).

2.4. DIABETES MELLITUS E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado como um estado de desequilíbrio entre a produção de espécies reativas principalmente de oxigênio (ROS) e a capacidade antioxidante endógena, ou seja, o estresse é estabelecido quando a um excesso de ROS ou quando há uma diminuição das defesas antioxidantes próprias (TANIYAMA; GRIENGLING, 2003).

As chamadas espécies reativas de oxigênio são definidas como átomos, íons ou moléculas que contem oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizados por sua grande instabilidade e alta reatividade. Podendo reagir assim com as principais classes de biomoléculas, sendo os lipídeos os mais suscetíveis. Alguns exemplos de ROS são: Superóxido O_2^- , Hidroxila OH,

Peróxidos lipídicos, Peróxido de hidrogênio H₂O₂ entre outros (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995; REIS et al., 2008). Esse excesso de ROS pode atuar prejudicando a sobrevivência e longevidade da célula, modulando os mecanismos de apoptose e podendo levar a necrose celular. Isso ocorre, pois pode haver danos à nível de membrana, DNA, mitocôndrias e outras lesões nas organelas citoplasmáticas (MAIESE, 2015).

Já os agentes antioxidantes podem ser definidos como qualquer molécula ou substância cuja disponibilidade, mesmo em baixas concentrações, iniba ou atrase a oxidação de um substrato. Existem diversas espécies de moléculas endógenas (sintetizadas internamente) ou exógenas (consumidas) que desempenham esse papel de defesa antioxidante e também podem ser consideradas biomarcadores do estresse oxidativo (SOMOGYI et al., 2007). Como por exemplo, glutathione (oxidada/reduzida), vitaminas C e E, cistina, moléculas degradadoras de ROS (ROS scavengers), ácido úrico, α -tocoferol, enzimas como catalase e superóxido dismutase (FREI; STOCKER; AMES, 1988; STINEFELT et al., 2005). Acredita-se que a albumina também seja uma proteína antioxidante, porém mais plasmática (FAURE et al., 2005; MERA et al., 2005). Ademais outra substância endógena que está se destacando atualmente como um potente antioxidante é a melatonina (REITER et al., 2016).

O estado hiperglicemiante do diabetes, com consequente aumento de ROS, reduz os níveis de óxido nítrico (NO) ativando a aldose redutase. E atua no aumento do fluxo de glicose pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ROS, determinando maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo NADPH e glutathione (antioxidante intracelular) e aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. O sorbitol é convertido à frutose, resultando aumento da relação NADH: NAD⁺, o que está associado com o aumento da síntese de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína kinase C (PKC) como mostrado na Figura 2 (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995). Essa via DGA-PKC é essencial na regulação da permeabilidade vascular, contratilidade, proliferação celular, angiogênese, ação de citocinas, adesão leucocitária. Isso faz com que a exacerbação dessa via modulada pelo estado hiperglicemiante constante seja um dos mecanismos preponderantes na patogênese das complicações dessa doença como bem mostrado na Figura 3 (KOYA; KING, 1998).

Muitos estudos mostram de forma direta a relação do estresse oxidativo e o diabetes tipo I, porém ainda são poucos em relação ao quantitativo de informações sobre o DMII (REIS et al., 2008).

Em estudo feito em pacientes diabéticos Dominguez et al. (1998) demonstrou que dez dias após início clínico do diabetes já havia concentrações elevadas de malondialdeído (MDA) plasmático, que é um produto final da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, isso em relação ao grupo controle, sugerindo que radicais livres do oxigênio possam exercer seus efeitos nocivos em estados precoce da doença.

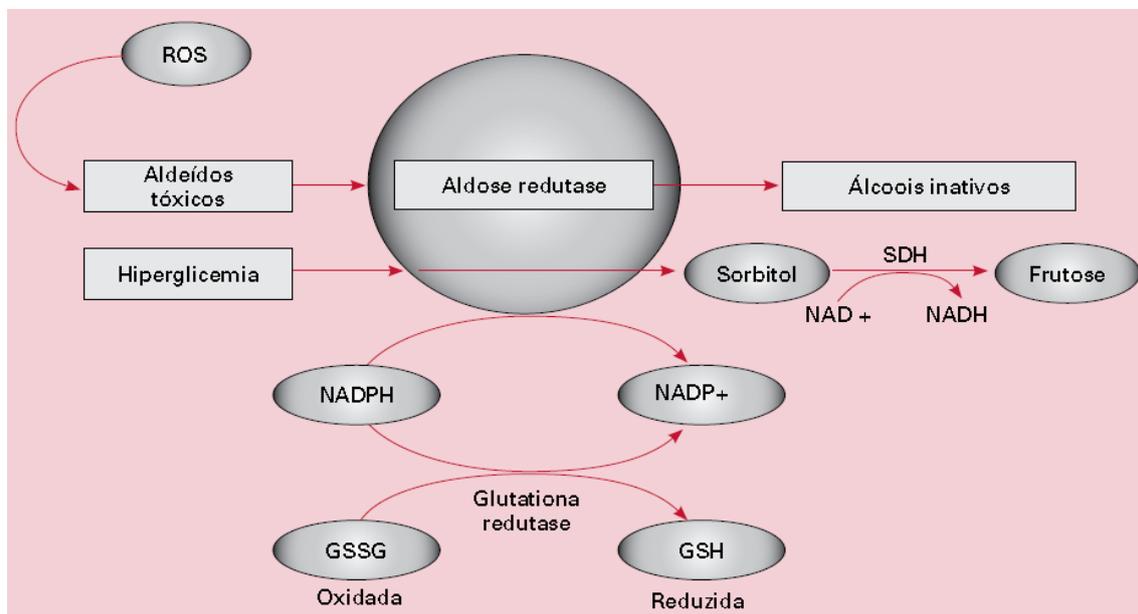


Figura 2. Aldose redutase e a via dos polióis. A redução da aldose reduz aldeídos gerados por espécies reativas de oxigênio (EROs) a álcoois inativos, e glicose em sorbitol, usando NADPH como co-fator. Nas células onde a atividade redutase de aldoses é suficiente para reduzir a glutatona reduzida (GSH), o estresse oxidativo é aumentado. A sorbitol desidrogenase (SDH) oxida o sorbitol em frutose usando NAD + como co-facto (BROWNLEE, 2001b).

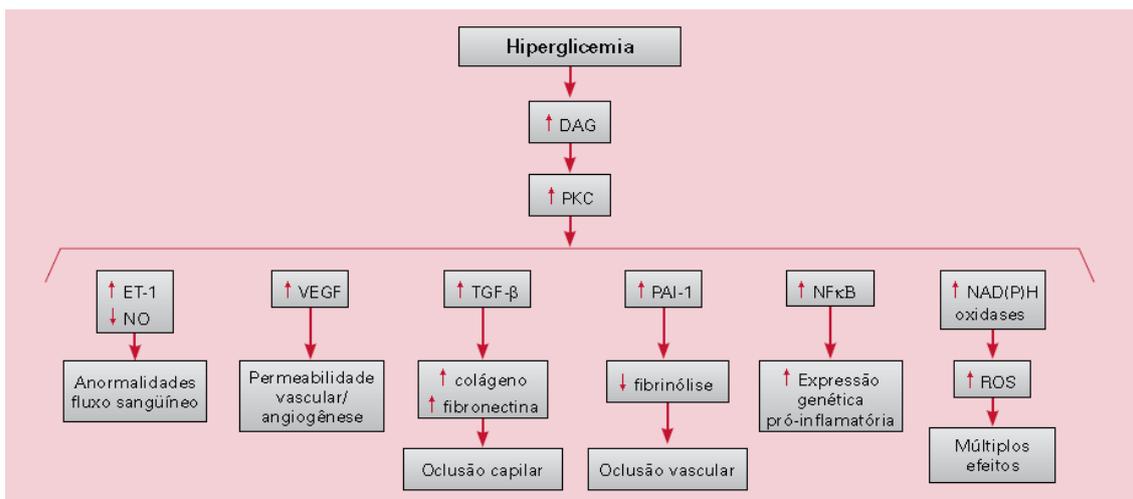


Figura 3. Anormalidades estruturais e funcionais decorrentes da ativação da via DAG-PKC hiperglicemia induzida. ET-1 = endotelina-1; NO = óxido nítrico; VEGF = fator de crescimento celular derivado do endotélio; TGF- β = fator transformador do crescimento beta; PAI-1 = inibidor do ativador do plasminogênio 1; NF κ B = fator nuclear κ -B; NAD(P) = H forma reduzida de NADP+; ROS = espécies reativas de oxigênio.(BROWNLEE, 2005)

Silva et al. (2011) em estudo com ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina demonstrou que os níveis teciduais de enzimas antioxidantes estavam bem diminuídos nos animais diabéticos em relação ao grupo controle, em alguns o valor caiu quase pela metade. Mera et al. (2005) teve achados parecidos pois houve diminuição da defesa antioxidante com consequente aumento do estresse oxidativo, além disso, segundo o mesmo autor há indicativo que as complicações do diabetes tanto são exacerbadas como exacerbam o estresse oxidativo.

Nesse ínterim a melatonina vem mostrando bastantes efeitos positivos para amenizar as complicações do diabetes, inclusive através de sua potente capacidade antioxidante (JIANG et al., 2016; REZVANFAR et al., 2017; SALMANOGLU et al., 2016). Em comparação com outras moléculas sinalizadoras as suas numerosas ações farmacológicas são ditas como excepcionais (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

2.5. MELATONINA

A melatonina ou *N*-acetil-5-metoxitriptamina é uma indolamina (por ter uma estrutura química indol). É o principal hormônio sintetizado pela glândula pineal nos

vertebrados (AXELROD, 1974; COMMENTZ; HELMKE, 1995). Mas pode também ser produzida por outras estruturas (fontes secundárias de produção) como retina, intestino, pele, plaquetas, medula óssea e provavelmente em outros locais, cuja contribuição sistêmica é mínima (STEFULJ et al., 2002). Foi descoberta pelo dermatologista Lerner et al. (1958) em pineais de bovinos. Essa molécula recebeu essa nomeação pelo fato de que ilumina a pele de rãs pela contração dos melanóforos, por isso do nome, ou seja, hormônio que contrai melanóforo; grego: μέλας = preto; τένος = tensão, no sentido de contração (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005).

Esta é uma indolamina (Figura 4), nos quais os dois grupos funcionais não lhe dão somente capacidade para a especificidade da ligação ao receptor, mas também para sua anfifilicidade fazendo com que essa molécula entre em qualquer célula, compartimento ou fluido corporal (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006; POEGGELER BURKHARD et al., 2002). Na medida em que esta se difunde através das membranas biológicas com facilidade, ela pode exercer ações em quase todas as células do corpo. Alguns de seus efeitos são mediados por receptores, enquanto outros são independentes do receptor (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

Esse hormônio pineal possui dois tipos de receptores: o MT1 e o MT2. Estes por sua vez são proteínas transmembrana que a atravessam sete vezes e são acoplados a proteína G. A sinalização intracelular é modulada pela modificação das atividades do adenilato ciclato, fosfolipase C (PLC), guanilato ciclase e canais de cálcio e potássio (PANDI-PERUMAL et al., 2008).



Figura 4. Estrutura química da molécula da melatonina (HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006).

Os receptores MT1 são expressos em diferentes tecidos e órgãos como retina, ovário, testículos, vesícula biliar, aorta, fígado, rim, pele e sistema cardiovascular (SINGH; JADHAV, 2014; SLOMINSKI et al., 2008). Estes receptores foram clonados a 20 anos atrás de ovelhas e humanos e têm 350 aminoácidos de comprimento. A ativação desse receptor inibe a adenilil ciclase, que diminui a produção de AMPc e reduz a ação da proteína quinase. Como efeito desse processo ocorre a fosforilação da proteína de ligação a elementos responsiva a cAMP (CREB). O receptor MT1 também ativa a fosfolipase, que regula o fluxo iônico dentro da célula (SINGH; JADHAV, 2014).

Já o receptor MT2 foi clonado em 1995 da retina do cérebro e da glândula pituitária humana e tem cerca de 363 aminoácidos. A ligação da melatonina a este receptor inibe a adenilil ciclase e diminui o AMPc. Através do receptor MT2, a melatonina também inibe a guanilil ciclase e reduz a formação de GMPc; ademais, é através da PLC, que a melatonina afeta a proteína quinase, que é responsável pelo fluxo iônico dentro da célula.

Existem também os receptores MT3 (quinona redutase II), mas estes ainda não foram identificados em humanos, porém já se tem conhecimento que já foram expressos em hamster, principalmente no fígado e nos rins. Esses receptores, diferente dos outros, tem menos afinidade pela melatonina, não estão acoplados à proteína G e não são sensíveis a Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} (PANDI-PERUMAL et al., 2008; SLOMINSKI et al., 2012).

O estopim da síntese de melatonina ocorre através da transformação do aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano através da enzima triptofano hidroxilase (TPH). A concentração de triptofano na pineal é bastante elevada, sendo captado da circulação, provavelmente, por um mecanismo de transporte de aminoácidos neutros (VILLELA, 2008). Na glândula pineal a enzima TPH apresenta um ritmo circadiano de atividade, com taxas mais elevadas na parte da noite, promovendo um aumento na produção de 5-hidroxitriptofano durante a noite. Esse aumento da atividade em duas vezes durante a noite deve-se tanto à sua síntese aumentada, quanto pela indução da transcrição gênica e síntese de proteínas, como a ativação de enzimas por fosforilação (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; SHIBUYA; TORU; WATANABE, 1977; SITARAM; LEES., 1984). Tanto o ritmo do RNAm da TPH, bem como o ritmo de atividade da enzima são induzidos por estimulação noradrenérgica,

através da via AMPc e PKA, a qual fosforila a proteína CREB levando a transcrição da enzima TPH (BOADLE-BIBER, 1979; SHEIN; WURTMAN, 1971; SITARAM; LEES 1984). A fosforilação da TPH pode ser feita pela PKA, pela quinase dependente de cálcio (CaMK) e pela PKC (BERNARD et al., 1999; SHEIN; WURTMAN, 1971; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003).

O produto formado pela TPH, o 5-hidroxitriptofano sob a ação da descarboxilase 1 aminoácido aromático é transformado em serotonina, ou 5-hidroxitriptamina. Durante o período da noite há a ativação da via metabólica mais importante a partir da serotonina, a qual leva a síntese da melatonina. Onde há a redução da serotonina durante o período noturno graças à ativação da arilalquilamina-N-acetiltransferase (AA-NAT) que transforma serotonina em N-acetil serotonina, e esta logo em seguida é oxi-metilada pela enzima hidroxí-indol-O-metiltransferase (HIOMT) dando origem à N-acetil-5-metoxitriptamina, a melatonina (Figura 5) (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; HARDELAND; PANDI-PERUMAL; CARDINALI, 2006; PANDI-PERUMAL et al., 2006; SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003; STEFULJ JASMINKA et al., 2002). Dentre vários outros pontos extra pineal da biossíntese da melatonina, o gastrointestinal é de particular importância, pois produz quantidades de melatonina excedendo várias centenas de vezes as encontradas na glândula pineal. A melatonina gastrointestinal também pode ser liberada na circulação, especialmente sob a influência de altos níveis dietéticos de triptofano (BUBENIK, 2002).

O fígado elimina 90% deste hormônio circulante e é o principal local do seu metabolismo. Cerca de 1% desta aparece inalterada na urina (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; FRANCIS et al., 1987). No fígado ocorre primeiro a hidroxilação na posição C6 pelas mono-oxigenases do citocromo P₄₅₀ (isoenzimas CYP1A2, CYP1A1, CYP1B1) (Figura 5) e depois acontece a conjugação com o sulfato então é excretada na forma de 6-sulfatoximelatonina. A conjugação de glucuronido é extremamente limitada (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; PANDI-PERUMAL et al., 2006).

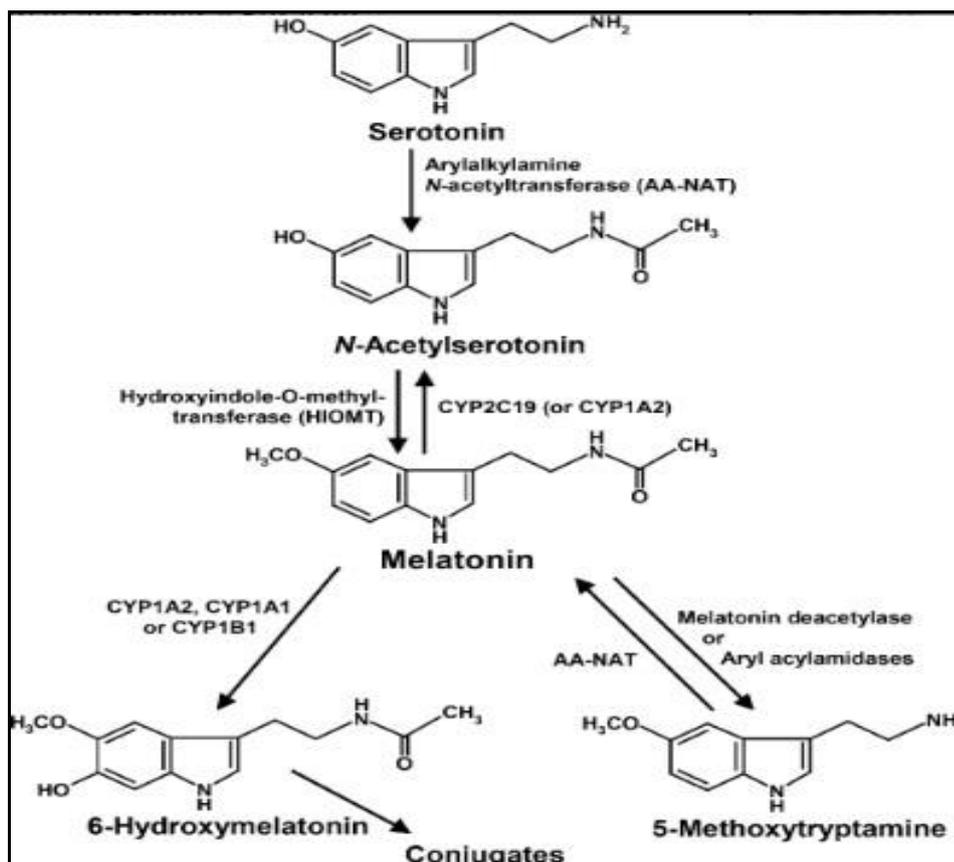


Figura 5. Formação da melatonina, com suas principais vias de catabolismo indólico e interconversões entre indolaminas bioativas. CYP, isoformas do citocromo P₄₅₀ (hidroxilases e demetilases (PANDI-PERUMAL et al., 2006).

CYP2C19 e, à taxas mais baixas, o CYP1A2 também desmetilam a melatonina em *N-acetil-serotonina*, sendo de certa forma também um de seus precursores (MA et al., 2005). Já o metabolismo nos tecidos extra-hepáticos exhibe certas diferenças cruciais. Por exemplo, nos tecidos de origem neural, incluindo a glândula pineal e a retina, há enzimas de desacetilação de melatonina, que são ou desacetilases de melatonina específicas ou em menor quantidade arilacilamidases específicas. Como a acetilcolinesterase eserina-sensível tem uma atividade lateral de arilacilamidase, a melatonina pode ser desacetilada em 5-metoxitriptamina em qualquer tecido que onde exista esta enzima (Figura 5) (HARDELAND et al., 1993; PANDI-PERUMAL et al., 2006). Essa indolamina também pode ser metabolizada não enzimaticamente em todas as células, e também extracelularmente, por radicais livres e alguns outros oxidantes. É convertido em 3-hidroximelatonina cíclica quando é retirado diretamente dois radicais hidroxila (TAN et al., 1998). Uma parte desse hormônio metabolizado é convertida em derivados de quinuramina, mas especificamente no

cérebro. E esse metabolitos como a *N*¹-acetil-*N*²-formil-5-metoxiquinuramina são de interesse, pois eles têm participação nas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dessa molécula (HIRATA et al., 1974; MAYO et al., 2005; RESSMEYER et al., 2003; TAN et al., 2002, 2001).

Esta indolamina é uma molécula ubíqua na natureza e acredita-se que suas ações sejam um dos mecanismos filogeneticamente mais antigos de todos os mecanismos biológicos de sinalização. E já foi identificada em todos os principais táxons de organismos como bactérias, eucariontes unicelulares e macroalgas, além de ser identificada também em diferentes partes de plantas (incluindo raízes, flores, caules e sementes) e em espécies de vertebrados e invertebrados (mamíferos, esponjas, anelídeos, queliceratos e equinodermos) (CLAUSTRAT; LESTON, 2015; HARDELAND RÜDIGER; POEGGELER BURKHARD, 2003; PANDI-PERUMAL et al., 2006).

Essa ocorrência generalizada indica uma alta idade evolutiva. Porém, em uma variedade tão notável de organismos filogeneticamente distintos, não se pode esperar que essa molécula exerça efeitos fisiológicos semelhantes em todos os organismos, pelo menos não em termos de sinalização (HARDELAND RÜDIGER; POEGGELER BURKHARD, 2003). Os seus principais efeitos fisiológicos estão relacionados com a duração da escuridão. Nesse contexto sua função é mediar os sinais do ciclo claro/escuro, com possíveis interferências no controle da ritmicidade e sazonalidade circadiana. Porém essa função principal, que é gerada à noite, é interpretada de maneiras diferente em animais noturnos e humanos (CLAUSTRAT; LESTON, 2015).

Estes seus papéis como moduladora e mediadora nas mudanças fisiológicas sazonais e comportamentais, de determinante do ciclo sono-vigília, da atividade reprodutora e metabólica de diversas espécies (MAGANHIN et al., 2008) são amplamente difundidos, principalmente em espécies onde esse ritmo fotoperiódico é realmente essencial. Porém por muito tempo os seres humanos foram tidos como uma espécie pouco sensível a tais variações, com quase nenhuma mudança entre a duração e liberação da mesma entre o verão e inverno por exemplo. Porém alguns estudos trazem uma posição contrária a essa perspectiva, mostrando que há certa controvérsia acerca do assunto. Nesses estudos (feito em locais muito frios e onde há mudanças nas estações mais marcantes) demonstrou-se que há uma variação

sazonal entre os níveis de dessa hormona e seus efeitos fisiológicos. (KAUPPILA et al., 1987; YONEYAMA; HASHIMOTO; HONMA, 1999).

Em contrapartida estas respostas ao ritmo sazonal em humanos não é tão marcante, quanto em outras espécies que respondem a essas mudanças temporais. Nesse ínterim, outros estudos demonstraram que fatores nutricionais e ambientais (luz artificial e atenuação das mudanças de temperatura nas sazões) tenham sido responsáveis pelo declínio da sazonalidade humana. E em meio urbanos principalmente não se verificou mudanças sazonais nos perfis melatonina, cortisol, tireotropina e temperatura retal em homens expostos à luz natural e artificial (WEHR, 2001; WEHR et al., 1995).

Na atualidade essa indolamina tem ganhado papel de destaque também com sua função chave na regulação e modulação do sistema imunológico. Essa relação melatonina/sistema imunológico só é possível graças a onipresença dos seus receptores e sua síntese nesse sistema (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010). A inibição farmacológica de sua síntese pelo propranolol causou supressão das respostas imunológicas humorais e celulares em camundongos (GUERRERO; REITER, 2002). Já a ablação da pineal levou a uma perda substancial do peso em órgãos linfoides primários e secundários e uma consequente diminuição nos componentes e funções celulares associados às respostas inatas e específicas (CARRILLO-VICO et al., 2005, 2006). Mostrando assim sua importante função na modulação da imunidade. Demonstrou-se também que o interferon gama aumenta a sua produção nas glândulas pineais cultivadas *in vitro* (WITHYACHUMNARNKUL et al., 1990) e que o fator estimulador de colônia de granulócitos(G-CSF) e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) estimulou a sua síntese *in vivo* e *in vitro* (ZYLIŃSKA et al., 1995). E, além disso, esse hormônio mostrou ter a capacidade de controle dos ritmos diurnos e sazonais da proliferação de leucócitos e da atividade das células NK (DRAZEN et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2001).

Como uma clássica e potente molécula anti-inflamatória ela pode reduzir lesões teciduais oxidativas e inibir seletivamente as fases tardia/crônica da resposta inflamatória. Bem como poderia atuar no início desse processo, estimulando mediadores químicos como o ácido araquidônico, estimulando ainda mais essa via. No geral essa indolamina poderia evitar as complicações crônicas da inflamação

(RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010). Nos últimos anos foi relatado também que a melatonina possui importantes funções como uma molécula antiviral, antibiótica e antiparasitária. Além disso, um grupo substancial de pesquisas destacou o aumento da sobrevivência de animais submetidos a choque séptico após a sua administração (BAGNARESI et al., 2012; CARRILLO-VICO et al., 2013; SRINIVASAN; MOHAMED; KATO, 2012).

Outras propriedades associadas à esta molécula são: maior cicatrização óssea (YILDIRIMTURK et al., 2016); tratamento contra o cancer (LISSONI et al., 2003; XIN et al., 2015); efeito antiapoptótico (FERREIRA et al., 2010,; RADOGNA et al., 2008); capacidade ateroprotetora (FAVERO et al., 2014); prevenção contra lesões isquêmicas (AKTAS et al., 2011); proteção contra doenças neurodegenerativas (SRINIVASAN et al., 2005) e alta atividade antioxidante (GOBBO et al., 2015; REITER et al., 2016; TEIXEIRA, 2003; ZHANG; ZHANG, 2014).

A importância e influência da melatonina no metabolismo dos carboidratos ainda é fonte de controvérsia entre os autores. No sentido de uns atestarem que há uma relação e de outros que afirmam o contrário. Porém há relatos de que esse hormônio pineal está associado com aumento da tolerância à glicose e glicogênese muscular e hepática. Além de que a pinealectomia diminuiu a secreção de insulina, a tolerância à glicose, assim como aumentou a concentração de piruvato no sangue (NANU et al., 1979; PESCHKE, 2008). Ademais mutações genéticas no receptor MT2 da melatonina em humanos estão associadas com risco elevado no desenvolvimento do diabetes (ESPINO; RODRIGUEZ; PARIENTE, 2018; PESCHKE; MÜHLBAUER, 2010).

Com o envelhecimento a síntese desta molécula decai e com ela há um prejuízo na sinalização da insulina, levando a uma resistência à mesma. Porém a suplementação com melatonina mostrou capacidade de aumentar a sensibilidade à insulina e prevenir a resistência relacionada à idade (RICARDO et al., 2013). Outros atestam resultados semelhantes com redução da insulinemia em ratos diabéticos (AHMAD et al., 2011)

Moléculas ou substâncias com capacidade farmacêutica de atividade sutil (que podem ser chamadas de compostos inteligentes), porém de origem natural, com capacidade de limitar, regular e combater a inflamação crônica estão no centro das pesquisas atualmente. As moléculas endógenas que podem servir como suplemento

exógeno aumentando assim os níveis fisiológicos normais do organismo e mudando o tempo ou a localização dentro do corpo em relação a sua síntese endógena como a melatonina, podem ser uma ferramenta terapêutica potencial para a melhora da saúde humana (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010). Inclusive contra doenças de cunho inflamatório e que são ditas como problemas de saúde pública mundial como é a diabetes (OZKANLAR et al., 2016; SHARMA et al., 2015; SHE; LAUDON; YIN, 2014).

2.6. MELATONINA, DIABETES E ESTRESSE OXIDATIVO

A melatonina atualmente está se destacando através da sua capacidade antioxidante protetora para diversas doenças onde o estresse oxidativo é participante ativo da sua patogênese como o diabetes (MEDZHITOV, 2008; RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010; REITER et al., 2016; SHARMA et al., 2015).

Segundo Reiter et al. (2003), a ação antioxidante da melatonina parece agir por diferentes vias: 1. Como neutralizador direto de Radicais Livres; 2. Como antioxidante indireto via estimulação de enzimas antioxidantes; 3. Aumentando a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial e reduzindo o vazamento de elétrons (diminuindo, com isso, a geração de radicais livres); 4. Aumentando a eficiência de outros antioxidantes. Diferentemente de outros antioxidantes bastante lipofílicos, como é o caso da vitamina E, que é inicialmente presa na membrana plasmática, a melatonina passa pelas membranas celulares, alcançando facilmente compartimentos intracelulares, particularmente, a mitocôndria (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011). Porém quando a melatonina passa pelas membranas celulares, ela se localiza, principalmente, em posição superficial nas bicamadas lipídicas, próxima à cabeça polar dos fosfolípidos da membrana. Nessa posição, ela é capaz de funcionar como um “removedor” (scavenger) de radicais livres e também promover meios indiretos pelos quais as membranas podem resistir ao dano oxidativo, estabilizando a fluidez da membrana e preservando sua eficiência (REITER, 2000). Esta estabilização também ocorre na membrana interna das mitocôndrias, o que poderia melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Esta indolamina possui propriedades redutoras devido à presença de um anel aromático rico em elétrons, funcionando como um doador de elétrons (JOU et al., 2007). O seu potencial redutor exerce uma regulação nas atividades dos complexos I e IV da mitocôndria, o que sugere que ela pode interagir com componentes da cadeia de transporte de elétrons, aumentando o fluxo de elétrons e, conseqüentemente, a produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (CARPENTIERI et al., 2012).

Muitos estudos atualmente indicam a suplementação com a melatonina como uma importante alternativa terapêutica na prevenção contra o diabetes, tanto de suas complicações quanto de sua patogênese, indicando assim a importância de novos estudos que evidenciem e clareiem inclusive os efeitos protetores da suplementação com esse hormônio no início do diabetes (CARPENTIERI et al., 2012; RADIOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010; RICARDO et al., 2013; SHE; LAUDON; YIN, 2014). Em um trabalho feito por Sudnikovich et al. (2007) foi observado que a melatonina possui um efeito atenuador benéfico no controle de complicações vasculares diabéticas por estreptozotocina, como prevenção no aumento de óxido nítrico no plasma sanguíneo e tecido aórtico.

O tratamento com a mesma mostrou ainda, a capacidade de diminuir os níveis de malondialdeído e aumentar os níveis de glutathiona na aorta e corpo cavernoso na indução do diabetes por estreptozotocina (PASKALOGLU; ŞENER; AYANĞOLU-DÜLGER, 2004) e diminuiu os efeitos negativos do estresse oxidativo na lesão ovariana relacionada à diabetes (NAYKI et al., 2016). Ademais esse hormônio mostrou eficiência na redução da hiperglicemia, hiperlipidemia e na redução dos níveis de TNF- α e IL-1 (moléculas pró-inflamatórias) suprimindo assim parte da inflamação tanto em modelos diabéticos humanos quanto em animais (NISHIDA, 2005). Outros experimentos a validam como forma de tratamento coadjuvante, ou seja, junto com outros medicamentos no tratamento de complicações do diabetes. Como mostrado no trabalho de Motawi et al. (2016), onde houve diminuição dos efeitos deletérios, inclusive histopatológicos, da nefropatia diabética.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIL, A. et al. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. 381–388, 1 maio 2013.

AHMAD, A. et al. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 52, n. 2, p. 203–210, 26 jul. 2011.

AKBARZADEH, A. et al. Induction of diabetes by Streptozotocin in rats. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 60–64, 1 set. 2007.

AKTAS, A. et al. Protective effects of melatonin on testicular torsion and detorsion damage in Sprague–Dawley rats. **Int. j. morphol**, v. 29, n. 1, p. 7–15, 2011.

ALVES, M. G. et al. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 5, p. 626–635, maio 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014.

ARMAGAN, A. et al. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 595–600, set. 2006.

AXELROD, J. The Pineal Gland: A Neurochemical Transducer. **Science**, v. 184, n. 4144, p. 1341–1348, 28 jun. 1974.

BACCETTI, B. et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2673–2677, 1 out. 2002.

BAGNARESI, P. et al. The role of melatonin in parasite biology. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 1–6, 1 jan. 2012.

BAHEY, N. et al. Influence of insulin and testosterone on diabetic rat ventral prostate: Histological, morphometric and immunohistochemical study. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, n. 3, p. 151, 2014.

BERNARD, M. et al. Melatonin synthesis pathway: circadian regulation of the genes encoding the key enzymes in the chicken pineal gland and retina. **Reproduction Nutrition Development**, v. 39, n. 3, p. 325–334, 1999.

BERTOLUCI, M. C. et al. Endothelial dysfunction in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 416–426, mar. 2008.

BOADLE-BIBER, M. C. ACTIVATION OF TRYPTOPHAN HYDROXYLASE FROM SLICES OF RAT BRAIN STEM INCUBATED WITH Ns ,02'-DIBUTYRYL ADENOSINE-3':5'-CYCLIC MONOPHOSPHATE. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, p. 669–679, 1979.

BOJUNGA, J. et al. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 47, n. 12, p. 2072–2080, 1 dez. 2004.

BRADSHAW, E. M. et al. Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secrete Proinflammatory Cytokines Inducing Th17 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4432–4439, 1 out. 2009.

BROWNLEE, M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications**. Special Features. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/414813a>>. Acesso em: 4 maio. 2018a.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813, 13 dez. 2001b.

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 1 jun. 2005.

BUBENIK, G. A. REVIEW: Gastrointestinal Melatonin: Localization, Function, and Clinical Relevance. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 47, n. 10, p. 2336–2348, 1 out. 2002.

CARPENTIERI, A. et al. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437–444, abr. 2012.

CARRILLO-VICO, A. et al. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 189–200, 1 jul. 2005.

CARRILLO-VICO, A. et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. **Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000)**, v. 7, n. 5, p. 423–431, maio 2006.

CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin: Buffering the Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 8638–8683, 22 abr. 2013.

CARVALHO, O. F. DE et al. Oxidative effect of nitric oxide and male infertility. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33–38, jan. 2002.

CHEN, Y.-L. et al. Correlation between serum interleukin-6 level and type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, v. 94, p. 14–20, jun. 2017.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, n. 1, p. 11–24, 1 fev. 2005.

CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. Melatonin: Physiological effects in humans. **Neurochirurgie**, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, abr. 2015.

COMMENTZ, J. C.; HELMKE, K. Precocious Puberty and Decreased Melatonin Secretion due to a Hypothalamic Hamartoma. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 44, n. 6, p. 271–275, 1995.

COSENTINO, F.; EGIDY ASSENZA, G. Diabetes and Inflammation. **Herz**, v. 29, n. 8, p. 749–759, dez. 2004.

COSTA, C. F. P. DA. **Baixas doses de melatonina exógena no diabetes experimental = implicações para a estrutura, função e defesa antioxidante do testículo e epidídimo de ratos = Low doses of exogen melatonin under experimental diabetes: implications for rat testicular and epididimal structure, function and antioxidant defense**. Dissertação (Mestrado)—Campinas: Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, 2014.

- DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v. 369, n. 2–3, p. 131–135, 7 ago. 1995.
- DAVID, L. Z. DE et al. Possíveis implicações audiológicas do diabetes melito: uma revisão de literatura. **Revista CEFAC**, v. 17, n. 6, p. 2018–2024, dez. 2015.
- DOGAN, Y. et al. **Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in Insulin-Dependent Diabetic Children.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2006/059206/abs/>>. Acesso em: 22 maio. 2018.
- DOGANAY, S. et al. Comparison of serum NO, TNF- α , IL-1 β , sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. **Eye**, v. 16, n. 2, p. 163–170, 2002.
- DOMINGUEZ, C. et al. Oxidative Stress at Onset and in Early Stages of Type 1 Diabetes in Children and Adolescents. **Diabetes Care**, v. 21, n. 10, p. 1736–1742, 1 out. 1998.
- DRAZEN, D. L. et al. Melatonin enhancement of splenocyte proliferation is attenuated by luzindole, a melatonin receptor antagonist. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 5, p. R1476–R1482, 1 maio 2001.
- ERBAĞCI, A. B. et al. Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 645–650, nov. 2001.
- ESPINO, J.; RODRIGUEZ, A. B.; PARIENTE, J. A. Melatonin and oxidative stress in the diabetic state: clinical implications and potential therapeutic applications. **Current Medicinal Chemistry**, 9 abr. 2018.
- ESPOSITO, C. et al. Transglutaminase from Rat Coagulating Gland Secretion POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS AND ACTIVATION BY PHOSPHATIDIC ACIDS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27416–27423, 11 jan. 1996.
- EVANS, J. M. M. et al. Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 17, n. 6, p. 478–480, 1 jun. 2000.
- FAIRBURN, C. G.; MCCULLOCH, D. K.; WU, F. C. 9 The effects of diabetes on male sexual function. **Clinics in Endocrinology and Metabolism**, Disease of Sex and Sexuality. v. 11, n. 3, p. 749–767, 1 nov. 1982.
- FAURE, P. et al. Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal. **Diabetes Metab**, p. 9, 2005.
- FAVERO, G. et al. Melatonin and its atheroprotective effects: A review. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 2, p. 926–937, fev. 2014.
- FERREIRA, C. DA S. et al. Melatonina: modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 1 jan. 2010.
- FRANCIS, P. L. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric assay for 6-hydroxymelatonin sulfate and 6-hydroxymelatonin glucuronide in urine. **Clinical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 453–457, 1 abr. 1987.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 24, p. 9748–9752, 1 dez. 1988.

FURMAN, B. L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. In: **Current Protocols in Pharmacology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2001.

GOBBO, M. G. et al. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs of Rats under Experimental Diabetes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GUERRERO, J. M.; REITER, R. J. Melatonin-Immune System Relationships. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 167–179, 2002.

GUNELI, E. et al. Effect of Melatonin on Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetes Rats. **European Surgical Research**, v. 40, n. 4, p. 354–360, 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HARDELAND, R. et al. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 3, p. 347–357, set. 1993.

HARDELAND, R.; PANDI-PERUMAL, S. R.; CARDINALI, D. P. Melatonin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 3, p. 313–316, mar. 2006.

HARDELAND RÜDIGER; POEGGELER BURKHARD. Non-vertebrate melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 34, n. 4, p. 233–241, 26 mar. 2003.

HEINDEL, J. J.; TREINEN, K. A. Physiology of the Male Reproductive System: Endocrine, Paracrine and Autocrine Regulation. **Toxicologic Pathology**, v. 17, n. 2, p. 411–445, 1 fev. 1989.

HERR, R. R.; JAHNKE, H. K.; ARGOUDELIS, A. D. Structure of streptozotocin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 18, p. 4808–4809, ago. 1967.

HIJAZI, R. A.; BETANCOURT-ALBRECHT, M.; CUNNINGHAM, G. R. Gonadal and erectile dysfunction in diabetics. **Medical Clinics of North America**, Type 2 Diabetes Mellitus. v. 88, n. 4, p. 933–945, 1 jul. 2004.

HIRATA, F. et al. In Vitro and in Vivo Formation of Two New Metabolites of Melatonin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 4, p. 1311–1313, 25 fev. 1974.

HISSA, M. N.; HISSA, A. S. R.; BRUIN, V. M. S. DE. Tratamento do diabetes mellitus tipo 1 com bomba de infusão subcutânea contínua de insulina e insulina lispro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 5, p. 487–493, out. 2001.

HUSSAIN, M. J. et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. **Diabetologia**, v. 39, n. 1, p. 60–69, 1 jan. 1996.

IMAMURA, F. et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: systematic

review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. **BMJ**, v. 351, p. h3576, 21 jul. 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/component/attachments/?task=download&id=164>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas - 8^o edition**. Organização Internacional. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

JIANG, G. Y. Practical Diabetes. In **Beijing People's Health Publishing House.**, v. 295, 1996.

JIANG, T. et al. Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

JOU, M.-J. et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389–403, 24 ago. 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: Texto & Atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAUPPILA, A. et al. Inverse Seasonal Relationship Between Melatonin and Ovarian Activity in Humans in a Region With a Strong Seasonal Contrast in Luminosity. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 65, n. 5, p. 823–828, 1 nov. 1987.

KÖHLER, T. S. et al. Prevalence of Androgen Deficiency in Men with Erectile Dysfunction. **Urology**, v. 71, n. 4, p. 693–697, 1 abr. 2008.

KOYA, D.; KING, G. L. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes**, v. 47, n. 6, p. 859–866, 1 jun. 1998.

KUZUYA, T. et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes research and clinical practice**, v. 55, n. 1, p. 65–85, 2002.

LA VIGNERA, S. et al. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. **Minerva Endocrinologica**, v. 34, n. 1, p. 1–9, mar. 2009.

LA VIGNERA, S. et al. Ultrasound characterization of the seminal vesicles in infertile patients with type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Radiology**, v. 80, n. 2, p. e64–e67, nov. 2011.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587–2587, maio 1958.

LEVIN, R.; RILEY, A. The physiology of human sexual function. **Psychiatry, Sexual disorder and psychosexual therapy**. v. 6, n. 3, p. 90–94, 1 mar. 2007.

LISSONI, P. et al. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. **Journal of Pineal Research**, v. 35, n. 1, p. 12–15, 1 ago. 2003.

LONG, L. et al. Hyperglycemia induced testicular damage in type 2 diabetes mellitus rats exhibiting microcirculation impairments associated with vascular endothelial growth factor decreased via PI3K/Akt pathway. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 5321, 12 jan. 2018.

LUE, T. F. et al. **Sexual Dysfunction in Diabetes**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2017a.

LUE, T. F. et al. **Sexual Dysfunction in Diabetes**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279101/>>. Acesso em: 7 mar. 2018b.

MA, X. et al. Metabolism of Melatonin by Human Cytochromes P450. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 4, p. 489–494, 1 abr. 2005.

MAGANHIN, C. C. et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 3, p. 267–271, jun. 2008.

MAIESE, K. New Insights for Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

MALIK, V. S. et al. Sugar-Sweetened Beverages and Risk of Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes: A meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 33, n. 11, p. 2477–2483, 1 nov. 2010.

MARESCH, C. C. et al. Hyperglycemia is associated with reduced testicular function and activin dysregulation in the Ins2Akita+/-mouse model of type 1 diabetes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 446, p. 91–101, 5 maio 2017.

MARTÍN-HIDALGO, D. et al. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v. 75, n. 8, p. 1550–1560, 1 maio 2011.

MATSUMOTO, Y. et al. Total Sleep Deprivation Induces an Acute and Transient Increase in NK Cell Activity in Healthy Young Volunteers. **Sleep**, v. 24, n. 7, p. 806–811, 1 out. 2001.

MAYO, J. C. et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 165, n. 1–2, p. 139–149, ago. 2005.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 24 jul. 2008.

MERA, K. et al. Oxidation and Carboxy Methyl Lysine-Modification of Albumin: Possible Involvement in the Progression of Oxidative Stress in Hemodialysis Patients. **Hypertension Research**, v. 28, n. 12, p. 973–980, 2005.

MOSTAFAVI, S.-A. et al. Role of Melatonin in Body Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 23, 27 set. 2017.

MOTAWI, T. K. et al. Combination of melatonin and certain drugs for treatment of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Diabetology International**, v. 7, n. 4, p. 413–424, dez. 2016.

MOURA, L. R.; CERESÉR, K. M. M. **Pharmacological aspects of sildenafil citrate in erectile dysfunction treatment**. Disponível em:

<http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?id_materia=1877&fase=imprime>. Acesso em: 10 maio. 2018.

NANU, L. et al. Effects of crinofizin administration in experimental diseases with protein anabolism disorders. Studies in the rat. **Endocrinologie**, v. 17, n. 3, p. 171–176, 1979.

NASCIMENTO, K. C.; GIAMI, A.; RUSSO, J. Da impotência à disfunção erétil. Destinos da medicalização da sexualidade. **Physis-Revista de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 3, 2009.

NATHAN, D. M. Diabetes: Advances in Diagnosis and Treatment. **JAMA**, v. 314, n. 10, p. 1052, 8 set. 2015.

NAYKI, U. et al. The effect of melatonin on oxidative stress and apoptosis in experimental diabetes mellitus-related ovarian injury. **Gynecological Endocrinology**, v. 32, n. 5, p. 421–426, 3 maio 2016.

NISHIDA, S. Metabolic Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. **Endocrine**, v. 27, n. 2, p. 131–136, 2005.

OGURTSOVA, K. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 128, p. 40–50, 1 jun. 2017.

OMOLAOYE, T. S.; SKOSANA, B. T.; DU PLESSIS, S. S. Diabetes mellitus-induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 2, p. 103–109, fev. 2018.

OZGUNER, F.; BARDAK, Y.; COMLEKCI, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 83–88, 1 jan. 2006.

OZKANLAR, S. et al. Melatonin Modulates the Immune System Response and Inflammation in Diabetic Rats Experimentally-Induced by Alloxan. **Hormone and Metabolic Research**, v. 48, n. 02, p. 137–144, abr. 2016.

PANDI-PERUMAL, S. et al. Physiological effects of melatonin: Role of melatonin receptors and signal transduction pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 85, n. 3, p. 335–353, jul. 2008.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin. **FEBS Journal**, v. 273, n. 13, p. 2813–2838, 1 jul. 2006.

PASKALOGLU, K.; ŞENER, G.; AYANĞOLU-DÜLGER, G. Melatonin treatment protects against diabetes-induced functional and biochemical changes in rat aorta and corpus cavernosum. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 3, p. 345–354, 24 set. 2004.

PENSON, D. F. et al. Do Impotent Men With Diabetes Have More Severe Erectile Dysfunction and Worse Quality of Life Than the General Population of Impotent Patients?: Results from the Exploratory Comprehensive Evaluation of Erectile Dysfunction (ExCEED) database. **Diabetes Care**, v. 26, n. 4, p. 1093–1099, 1 abr. 2003.

PESCHKE, E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 1, p. 26–40, 1 jan. 2008.

PESCHKE, E.; MÜHLBAUER, E. New evidence for a role of melatonin in glucose regulation. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 24, n. 5, p. 829–841, 1 out. 2010.

POEGGELER BURKHARD et al. Melatonin's unique radical scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. **Journal of Pineal Research**, v. 33, n. 1, p. 20–30, 16 jul. 2002.

PORTO, E. M. et al. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 11, p. 1040–1048, 20 abr. 2011.

RADOGNA, F. et al. Melatonin antagonizes the intrinsic pathway of apoptosis via mitochondrial targeting of Bcl-2. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p. 316–325, 1 abr. 2008.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical Pharmacology**, Inflammation 2010 - Inflammatory Cell Signaling Mechanisms as Therapeutic Targets. v. 80, n. 12, p. 1844–1852, 15 dez. 2010.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S.; OLIVEIRA, P. J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. **Current diabetes reviews**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2008.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, 2008.

REITER, R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **Physiology**, v. 15, n. 5, p. 246–250, 1 out. 2000.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. v. 50, p. 20, 2003.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, 1 out. 2016.

RESSMEYER, A.-R. et al. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. **Redox Report**, v. 8, n. 4, p. 205–213, ago. 2003.

REZVANFAR, M. R. et al. Effect of bedtime melatonin consumption on diabetes control and lipid profile. **International Journal of Diabetes in Developing Countries**, v. 37, n. 1, p. 74–77, mar. 2017.

RIBEIRO, D. L. et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 1, p. 51–60, 2006.

RICARDO, Z. et al. Melatonin improves insulin sensitivity independently of weight loss in old obese rats. **Journal of Pineal Research**, v. 55, n. 2, p. 156–165, 30 mar. 2013.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia Texto e Atlas - Em Correlação com Biologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

- SALMANOGLU, D. S. et al. Melatonin and L-carnitin improves endothelial dysfunction and oxidative stress in Type 2 diabetic rats. **Redox Biology**, v. 8, p. 199–204, ago. 2016.
- SARRIS, A. B. et al. Fisiopatologia, avaliação e tratamento da disfunção erétil: artigo de revisão. **Revista de Medicina**, v. 95, n. 1, p. 18–29, 21 jul. 2016.
- SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 263–267, set. 2004.
- SCHIAVI, R. C. et al. Diabetes mellitus and male sexual function: a controlled study. **Diabetologia**, v. 36, n. 8, p. 745–751, 1993.
- SEFTEL, A. D. et al. Advanced glycation end products in human penis: elevation in diabetic tissue, site of deposition, and possible effect through inos or enos. **Urology**, v. 50, n. 6, p. 1016–1026, 1 dez. 1997.
- SHARMA, S. et al. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 59, n. 5, p. 391–399, out. 2015.
- SHE, M.; LAUDON, M.; YIN, W. Melatonin receptors in diabetes: A potential new therapeutical target? **European Journal of Pharmacology**, v. 744, p. 220–223, 5 dez. 2014.
- SHEIN, H. M.; WURTMAN, R. J. Stimulation of [14C] tryptophan 5-hydroxylation by norepinephrine and dibutyryl adenosine 3', 5' monophosphate in rat pineal organ cultures. **Life Sciences**, v. 10, n. 16, p. 935–940, ago. 1971.
- SHIBUYA, H.; TORU, M.; WATANABE, S. A circadian rhythm of tryptophan hydroxylase in rat pineals. **Brain Research**, v. 138, n. 2, p. 364–368, 16 dez. 1977.
- SHIEH, J.-M. et al. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC ζ -Akt-GSK3 β pathway in hepatic cells. **Journal of Pineal Research**, v. 47, n. 4, p. 339–344, 1 nov. 2009.
- SHRILATHA, B. Occurrence of oxidative impairments, response of antioxidant defences and associated biochemical perturbations in male reproductive milieu in the Streptozotocin-diabetic rat. **International Journal of Andrology**, v. 30, n. 6, p. 508–518, dez. 2007.
- SILVA, A. M. DE O. et al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 121–130, 2011.
- SIMAS, J. N. et al. Resveratrol attenuates reproductive alterations in type 1 diabetes-induced rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 6, p. 312–328, 1 dez. 2017.
- SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters. **Pharmacological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 325–395, 1 jun. 2003.
- SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: functions and ligands. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 9, p. 1410–1418, set. 2014.

- SITARAM B. R.; LEES G. J. Effect of Oxygen on the Induction of Tryptophan Hydroxylase by Adrenergic Agents in Organ Cultures of Rat Pineal Glands. **Journal of Neurochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1183–1185, abr. 1984.
- SLOMINSKI, A. et al. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 17–24, jan. 2008.
- SLOMINSKI, R. M. et al. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: Distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 2, p. 152–166, abr. 2012.
- SOARES, L. C. et al. Histomorfologia de órgãos-alvo de ratos diabéticos suplementados com noni (*Morinda citrifolia*). **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 4, 28 dez. 2011.
- SOMOGYI, A. et al. Antioxidant measurements. **Physiological Measurement**, v. 28, n. 4, p. R41, 2007.
- SLOUDAMANI, S.; MALINI, T.; BALASUBRAMANIAN, K. Effects of Streptozotocin-Diabetes and Insulin Replacement on the Epididymis of Prepubertal Rats: Histological and Histomorphometric Studies. **Endocrine Research**, v. 31, n. 2, p. 81–98, jan. 2005.
- SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 13, n. 5, p. 4831–4839, 2016.
- SRINIVASAN, V. et al. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. **Neurotoxicity Research**, v. 7, n. 4, p. 293–318, 1 dez. 2005.
- SRINIVASAN, V.; MOHAMED, M.; KATO, H. Melatonin in Bacterial and Viral Infections with Focus on Sepsis: A Review. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 30–39, 2012.
- STEFULJ, J. et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **Journal of Pineal Research**, v. 30, n. 4, p. 243–247, 11 fev. 2002.
- STINEFELT, B. et al. Free Radical Scavenging, DNA Protection, and Inhibition of Lipid Peroxidation Mediated by Uric Acid. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 35, n. 1, p. 9, 2005.
- SUDNIKOVICH, E. J. et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 180–187, 27 ago. 2007.
- SUN, Y.-M. et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, n. 4, p. 359–361, 19 abr. 2013.
- TAN, D. et al. Chemical and Physical Properties and Potential Mechanisms: Melatonin as a Broad Spectrum Antioxidant and Free Radical Scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 181–197, 1 fev. 2002.
- TAN, D. X. et al. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 12, p. 2294–2296, out. 2001.

- TAN, D.-X. et al. A Novel Melatonin Metabolite, Cyclic 3-Hydroxymelatonin: A Biomarker of *Vivo* Hydroxyl Radical Generation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 3, p. 614–620, dez. 1998.
- TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 1 dez. 2003.
- TEIXEIRA, A. **Propriedades antioxidantes da melatonina: inibição de enzimas pró-oxidantes e ação contra a peroxidação lipídica**. Dissertação (Mestrado)—Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- TRINDADE, A. A. T. **ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES ALOXÂNICO NO RATO ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2010.
- VILLELA, D. C. M. **Síntese de melatonina na glândula pineal de ratos: modulação pelo glutamato**. Dissertação (Mestrado)—São Paulo: Universidade de São Paulo, 3 abr. 2008.
- WEHR, T. A. et al. Suppression of men's responses to seasonal changes in day length by modern artificial lighting. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 1, p. R173–R178, 1 jul. 1995.
- WEHR, T. A. Photoperiodism in Humans and Other Primates: Evidence and Implications. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, n. 4, p. 348–364, ago. 2001.
- WEISS, R. B. Streptozocin: a review of its pharmacology, efficacy, and toxicity. **Cancer Treatment Reports**, v. 66, n. 3, p. 427–438, mar. 1982.
- WITHYACHUMNARNKUL, B. et al. Interferon- γ Modulates Melatonin Production in Rat Pineal Glands in Organ Culture. **Journal of Interferon Research**, v. 10, n. 4, p. 403–411, 1 ago. 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Probability of dying per 1000 live births**. . Acesso em: 3 maio. 2018.
- XIN, Z. et al. Melatonin as a treatment for gastrointestinal cancer: a review. **Journal of Pineal Research**, v. 58, n. 4, p. 375–387, 1 maio 2015.
- XU, Y. et al. Studies on the mechanism of testicular dysfunction in the early stage of a streptozotocin induced diabetic rat model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 87–92, jul. 2014a.
- XU, Y. et al. Studies on the mechanism of testicular dysfunction in the early stage of a streptozotocin induced diabetic rat model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 450, n. 1, p. 87–92, jul. 2014b.
- YILDIRIMTURK, S. et al. The effects of supplemental melatonin administration on the healing of bone defects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 24, n. 3, p. 239–249, jun. 2016.
- YONEYAMA, S.; HASHIMOTO, S.; HONMA, K. Seasonal changes of human circadian rhythms in Antarctica. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 4, p. R1091–R1097, 1 out. 1999.

YU, K. et al. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 447, 17 fev. 2018.

ZHANG, H.-M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 131–146, 1 set. 2014.

ZIAEI-RAD, M.; VAHDANINIA, M.; MONTAZERI, A. Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 50, 2010.

ZYLIŃSKA, K. et al. Effect of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and granulocyte colony stimulating factor on melatonin secretion in rats In vivo and in vitro studies. **Journal of Neuroimmunology**, v. 56, n. 2, p. 187–190, 1 fev. 1995.

CAPÍTULO II

Mecanismos de ação da melatonina sobre os testículos de ratos diabéticos a nível celular e imunohistoquímico

Érique Ricardo Alves¹, Cintia Giselle Martins Ferreira¹, Vanessa da Silva Gomes¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Valdemiro Amaro da Silva Junior³, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹, Valéria Wanderley Teixeira*¹.

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

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

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, Brasil

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos –Recife-PE Brasil. CEP 52171-900. Tel. +55 813320-6389 E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (WANDERLEY TEIXEIRA,V.)

Resumo: O objetivo do presente estudo foi analisar os testículos de ratos diabéticos tratados com melatonina. Foram utilizados 50 ratos albinos divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução ao diabetes; GD: ratos induzidos ao diabetes e tratados com placebo; GDI: ratos induzidos ao diabetes e após confirmação tratados com insulina GDM: ratos induzidos ao diabetes e após confirmação tratados com melatonina e GDMS: ratos induzidos ao diabetes e simultaneamente tratados com melatonina. A melatonina foi administrada na dosagem de 10 mg/kg na água, todo dia durante 20 dias pela noite. O diabetes foi induzido pela estreptozotocina (60 mg/kg) e confirmada após cinco dias da indução. A insulina foi administrada em 5 UI/dia em diferentes momentos do dia durante 20 dias. Os testículos foram submetidos à análise histopatológica, morfométrica, imunohistoquímica e estresse oxidativo tecidual. Os animais tratados com melatonina tiveram redução nos níveis glicêmicos e de citocinas inflamatórias. Por outro lado, ocorreu um aumento das enzimas antioxidantes e manutenção dos níveis séricos de testosterona e receptores de andrógenos. Não se observou alterações na estrutura do epitélio germinativo suplementados com melatonina. Mostrando assim sua alta capacidade terapêutica.

Palavras-chave: Diabetes, imunohistoquímica, melatonina, ratos, testículo, estresse oxidativo.

Abstract: The aim of the present study was to analyze the testes of diabetic rats treated with melatonin. Fifty albino rats were divided into the following groups: GC: rats without diabetes induction; GD: rats induced to diabetes and treated with placebo; GDI: diabetes-induced and post-confirmation rats treated with GDM insulin: diabetes-induced and post-confirmation mice treated with melatonin and GDMS: diabetes-induced mice and simultaneously treated with melatonin. Melatonin was administered at a dosage of 10 mg / kg in water, every day for 20 days at night. Diabetes was induced by streptozotocin (60 mg / kg) and confirmed after the fifth day of induction. Insulin was administered at 5 IU / day at different times of the day for 20 days. The testes were submitted to histopathological, morphometric, immunohistochemical and tissue oxidative stress analysis. The animals treated with melatonin had a reduction in glycemic and inflammatory cytokine levels. On the other hand, there was an increase in antioxidant enzymes and maintenance of serum levels of testosterone and androgen receptors. There were no changes in the structure of the germinative epithelium supplemented with melatonin. Thus showing its high therapeutic capacity..

Keywords: Diabetes, immunohistochemistry, melatonin, rats, testis, oxidative stress.

1. Introdução

O diabetes mellitus é uma doença crônica que causa diversas complicações como distúrbios cardiovasculares, disfunção endotelial, nefropatia diabética, retinopatia e neuropatia (BERTOLUCI et al., 2008; KUZUYA et al., 2002; SCHEFFEL et al., 2004). Além disso, pode também impactar a saúde sexual e reprodutiva masculina (LUE et al., 2017a; RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008), levando cerca de 90% dos pacientes do sexo masculino com diabetes apresentarem algum distúrbio na função sexual (JIANG, 1996; PORTO et al., 2011).

Estudos demonstram que células de Leydig são altamente afetadas pelo diabetes, ocasionando a redução dos níveis séricos de testosterona (LA VIGNERA et al., 2009). Essa diminuição pode acarretar na atrofia e conseqüente diminuição do peso dos testículos e outros órgãos do sistema reprodutor (RIBEIRO et al., 2006), devido este órgão ser andrógeno dependente (CARVALHO et al., 2002).

Outras anormalidades podem estar relacionadas ao DM, como diminuição do desejo sexual (ZIAEI-RAD; VAHDANINIA; MONTAZERI, 2010), perda da libido (ALVES et al., 2013), oligospermia e azoospermia (OMOLAOYE; SKOSANA; DU PLESSIS, 2018). Ademais, o diabetes também é uma doença de cunho inflamatório, onde há um aumento de citocinas inflamatórias como o TNF- α e IL-6, IL-8 e IL-1, que estão associados com a progressão dessa doença (BRADSHAW et al., 2009; CHEN et al., 2017; COSENTINO; EGIDY ASSENZA, 2004; DOGAN et al., 2006; DOGANAY et al., 2002; ERBAĞCI et al., 2001; HUSSAIN et al., 1996).

O estresse oxidativo tem papel determinante nas lesões teciduais decorrentes do diabetes (BROWNLEE, 2001a; REIS et al., 2008). NO sistema reprodutor masculino, principalmente nos testículos (RAMALHO-SANTOS; AMARAL; OLIVEIRA, 2008). A melatonina, possui uma forte atividade antioxidante (GOBBO et al., 2015; REITER et al.,

2016; TEIXEIRA, 2003; ZHANG; ZHANG, 2014) e também atua como anti-inflamatória podendo evitar complicações crônicas da inflamação (RADOGNA; DIEDERICH; GHIBELLI, 2010).

O diabetes promove alterações na função sexual e reprodutiva (FAIRBURN; MCCULLOCH; WU, 1982; JIANG, 1996). Levando-se em consideração que existem poucos tratamentos na medicina reprodutiva especificamente adaptados para pacientes diabético e que os tratamentos convencionais não amenizam suas complicações a longo prazo (BACCETTI et al., 2002) e que segundo Bojunga et al. (2004) tratamentos com antioxidantes podem ser uma importante opção terapêutica para as complicações relacionadas à diabetes, além disso a melatonina vem mostrando efeitos promissores para amenizar as complicações dessa patologia (JIANG et al., 2016; REZVANFAR et al., 2017) torna-se de extrema importância investigar a ação da melatonina sobre os testículos de ratos diabéticos, como um possível tratamento para esse mal que atinge uma grande porção da população mundial.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) da linhagem Wistar, com idade em torno de 65 dias de idade, pesando em torno de 245 ± 25 g, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. O experimento foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado sob número de licença N° 80/ 2017. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceram um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 06:00 às 18:00h. Os animais foram divididos ao acaso em 5 grupos, cada um com 10 animais: GC: ratos sem indução ao diabetes pela estreptozotocina; GD: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com placebo; GDI: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com insulina durante 20 dias; GDM: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e após confirmação do diabetes tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg de peso corporal durante 20 dias; GDMS: ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e simultaneamente tratados com melatonina na dosagem de 10mg/kg de peso corporal durante 20 dias;

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 e confirmado no quinto dia após a aplicação. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente (DALL'AGO et al., 2002). Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram

glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), exceto do grupo controle, para início do tratamento com a melatonina ou insulina.

2.2. Administração da Melatonina

A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizada através da água de beber, no início da noite (18:00) durante 20 dias na dosagem de 10 mg/kg (SUDNIKOVICH et al., 2007). Para isso a melatonina foi dissolvida em etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI, 2006). Após a preparação, as garrafas foram protegidas da luz com auxílio de papel alumínio e disponibilizado aos animais (AGIL et al., 2013).

2.3. Administração da Insulina

A insulina foi administrada por via subcutânea durante 20 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10 h e três unidades restantes às 19 h (PINHEIRO et al., 2011).

2.4. Dosagem de Testosterona Total

As amostras de sangue foram coletadas antes da indução, 10 e 20 dias após tratamento. Para isso, os ratos foram imobilizados em contensor mecânico e o sangue coletado por punção da veia caudal lateral com uso de cateter (24G) (PEREIRA., 2001). Após centrifugação refrigerada, o plasma foi acondicionado em microtubo eppendorf, em duplicata, e congelado a -20°C até o momento das dosagens (TEIXEIRA et al., 2004). A testosterona plasmática foi determinada pelo método de ELISA utilizando "kit" comercial específico para rato (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

2.5. Níveis glicêmicos

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

2.6. Exame histopatológico dos testículos.

Os animais dos grupos experimentais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular e em seguida foram retirados os testículos. Após esse procedimento os animais foram eutanasiados com tiopental sódico 100 mg/kg. O material foi fixado em formol tamponado por 24 h e posteriormente, processado para inclusão em parafina e historesina. Posteriormente os cortes dos testículos foram submetidos à coloração de hematoxilina-floxina para análise histopatológica em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49. Tirando fotos na objetiva de 10x e 40x.

2.7. Morfometria

Foram feitas duas mensurações morfométricas: altura média do epitélio e diâmetro médio do epitélio. Para isso foram utilizadas fotos com um aumento de 10x e foram selecionados somente os túbulos em corte transversal e os mais circulares possíveis. Foram empregadas cinco lâminas de cada grupo, provinda de animais diferentes, e de cada lâmina foram tiradas fotos e selecionadas três túbulos de cada lâmina, totalizando 15 valores para cada grupo. Para a altura média do epitélio foram contabilizados quatro raios de cada túbulo pegando toda altura epitelial germinativa até o espermatozóide ou espermátide. Posteriormente esses quatro valores foram somados e divididos por quatro para se ter a altura média. Os mesmos túbulos utilizados para quantificar a altura do epitélio foram usados para medir o diâmetro tubular. Nesse caso mediram-se dois diâmetros em posição cruzada, então

esses valores foram somados e divididos por dois para se ter o diâmetro médio (TAKASHIBA et al., 2011). Essas quantificações foram feitas através do programa IMAGE J calibrado em micrômetros.

2.8. Cálculo do Índice gonadossomático

Foi utilizado para observação do aumento do peso dos testículos como um indicativo da ação do DM. Para tanto foi calculado a razão entre os pesos dos órgãos pelo peso corpóreo de cada animal, para a obtenção de seus respectivos índices gonadossomático (MORAIS et al., 2009), como na figura abaixo:

Onde:

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

IO: Índice gonadossomático / PO: Peso do órgão / PC: peso corporal.

2.9. Estresse Oxidativo Tecidual

A mensuração dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada pelo método de Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). Fragmentos do testículo foram macerados em banho de gelo com 5 mLK de KCl 1, 15% + EDTA 3mM por grama de tecido. Em seguida, 10 mg de tecido foram adicionados a um meio de reação contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,4%, ácido tricloroacético (TCA) 7,5% e ácido tiobarbitúrico 0,3%. Os tubos de reação foram selados e incubados a 95°C por 60 minutos. Após resfriamento em água corrente, foi adicionado um volume de n-butanol para cada volume de reação e os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos. A absorbância da fase orgânica foi mensurada em 535nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato. A

dosagem de proteína foi realizada pelo método de Folin, utilizando BSA como padrão (LOWRY et al., 1951).

Os níveis da glutatona reduzida (GSH) foram determinados através da mensuração de grupamentos sulfrídilas não protéicos (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A partir do homogenato obtido para avaliação da peroxidação lipídica, 80 a 160 mg do tecido foram precipitados em solução de TCA 5%. Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 4mM, EDTA 4mM e DTNB 4mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e a absorbância foi mensurada em 412 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato. Todas as dosagens foram realizadas em triplicata.

2.10. Imunohistoquímica (IL-6, TNF- α e Receptor de andrógeno)

A expressão de citocinas inflamatórias foi determinada utilizando os anticorpos para IL-6, TNF- α (Santa Cruz Biotechnology), e para a quantificação de receptores de andrógenos foi utilizado o anticorpo AR (441): SC-7305 (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:100. 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 para IL-6 e TNF- α , e pH 6 para AR) 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% por 1 hora. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS/BSA 1% (IL-6 e TNF- α) e 5% (AR) (por 1 hora. Subsequentemente as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por 30 minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marron após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por 4 minutos e contracolorados com hematoxilina (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001). em

microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49. Tirando fotos na objetiva de 40x. Foram tiradas fotos de 5 campos por rato, totalizando 25 campos por grupo. As imagens foram mensuradas através do programa GIMP 2.0 através da quantificação da tonalidade da cor em pixels.

2.11. Índice apoptótico (Apoptose por Imunofluorescência)

Os cortes foram inicialmente desparafinizados e hidratados e, logo em seguida incubados em PBS (pH 7,4) por 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida a proteinase K foi aplicada sobre as lâminas por 15 minutos. Os cortes foram lavados em PBS e incubados em tampão equilíbrio por 10 segundos em temperatura ambiente. Depois os cortes foram incubados em TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Então foi aplicada a solução stop por 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes em seguida foram lavados em PBS e incubados em antidigoxigenina por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram enxaguadas em PBS e foram montadas com o meio de montagem presente no kit e observadas e tirada as fotos em um microscópio confocal de fluorescência com varredura a laser da marca LSM 700 Carl Zeiss. O índice apoptótico foi determinado pela contagem da porcentagem de células positivas a partir de pelo menos 500 núcleos subdivididos em 10 campos escolhidos ao acaso (WU et al., 2013).

2.12. Análise estatística.

Os dados da quantificação dos níveis de testosterona e glicose, índice organossomático, pesos dos animais, peso dos órgãos, altura do epitélio, diâmetro tubular médio, índice apoptótico, expressão do TNF- α , IL-6, Receptor de andrógeno e dos níveis de TBARS e GSH

(estresse oxidativo) foram submetidos ao método não paramétrico de Kruskal-Wallis com *post-hoc* em Dunn ($P < 0,05$).

3. Resultados

3.1. Níveis glicêmicos

Antes do início do tratamento e indução (que está referido como dia BASAL) os animais apresentavam normoglicemia, em um estado não diabético. No dia zero (cinco dias após indução – confirmação do diabetes), os animais apresentaram níveis de glicose acima de 200mg/dl, o que confirmou o diabetes, exceto o grupo controle (GC) e o grupo diabético e tratado com melatonina simultânea (GDMS), que não diferiram significativamente. No décimo dia os animais do grupo diabético e tratado com insulina (GDI) e o grupo diabético e tratado com melatonina simultânea (GDMS) apresentaram valores que não diferiram do grupo controle. Já o grupo diabético tratado com melatonina (GDM) não apresentou diferenças em relação aos animais do grupo diabético (GD). No último dia de tratamento (20 dias) os animais dos grupos controle e o diabético tratado com insulina apresentavam-se semelhantes. Embora os animais do GDMS tenham apresentado níveis de glicose menores que os dos animais dos grupos GD e GDM, que apresentaram maiores níveis, diferiram significativamente dos animais dos grupos GC e GDI (Figura 1).

3.2. Peso dos Animais

Os pesos dos animais dos grupos experimentais aferidos antes do início do tratamento e da indução (referido no gráfico como dia BASAL), no dia zero (confirmação do diabetes), no décimo dia (meio do tratamento) e no vigésimo dia (final do tratamento) estão expressos na figura 5. No dia basal não houve diferenças significativas entre os grupos. Após a indução do diabetes (dia zero) houve uma redução significativa dos pesos dos animais com exceção do

grupo GC. Do décimo ao vigésimo dia de tratamento, os animais do grupo GC apresentaram maior peso, seguidos dos animais dos grupos GDI e GDMS, que não diferiram entre si. Os menores valores foram observados nos animais dos grupos GD e GDM (Figura 2).

3.3. *Peso dos Testículos*

Não houve diferenças significativas em nenhum dos grupos experimentais quanto ao peso dos testículos (Figura 3).

3.4. *Morfometria*

3.4.1. *Diâmetro Tubular Médio dos Túbulos Seminíferos.*

Os maiores valores de diâmetro tubular foram encontrados nos animais do grupo GC que diferiu de todos os outros. Os menores valores estavam presentes nos grupos GD e GDI que não diferiram entre si. Já o grupo GDM e GDMS apresentaram valores intermediários entre todos os grupos, porém não diferindo entre si, mas diferindo de todos os outros grupos (Figura 4B).

3.4.2. *Altura Média do Epitélio dos Túbulos Seminíferos.*

A maior média de altura epitelial foi encontrada nos animais do grupo GC que diferiu somente dos grupos GD e GDMS. O grupo GD apresentou menores valores. (Figura 4A).

3.5. *Índice Organossomático*

Para o índice organossomático dos testículos não houve diferenças estatísticas significativas, ou seja, todos os grupos foram semelhantes estatisticamente entre si (Figura 5).

3.6. *Estresse Oxidativo*

Na análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos testículos (Figura 6A) demonstrou que as maiores taxas foram encontrados nos animais dos grupos GD, GDM e GDMS que não diferiram entre si. Os animais do grupo GC apresentaram as menores taxas diferindo significativamente dos outros. E o grupo GDI não diferiu de nenhum dos grupos apresentados.

Os níveis de Glutationa Reduzida (GSH) testiculares (Figura 6B) demonstraram que os maiores valores foram verificados nos grupos GDMS, seguido do GC que não diferiram entre si. Já os grupos GD e GDI apresentaram as menores taxas e foram significativamente semelhantes entre si. O grupo GDM apresentou valores maiores que GD/GDI e menores que o GDMS, porém não diferiu significativamente do grupo controle.

3.7. *Níveis de Testosterona Total*

No décimo dia de tratamento a menor taxa de testosterona foi no grupo GD que diferiu de todos os outros. As taxas maiores foram encontradas nos grupos GC, GDI, GDM e GDMS que não diferiram entre si (Figura 7A). Já no vigésimo dia os níveis hormonais apresentaram o mesmo comportamento do décimo dia, porém assumindo valores mais próximo do controle (Figura 7B)

3.8. *Índice Apoptótico*

Na apoptose para Imunofluorescência não foi visto nenhuma marcação luminescente positiva (em vermelho – rodamina) para apoptose em nenhum dos grupos experimentais

3.9. *Histopatologia*

De acordo com a avaliação qualitativa da estrutura dos testículos dos animais de todos os grupos, não se observou alterações compatíveis com degeneração testicular. Todos os testículos

dos animais de todos os grupos apresentaram seus componentes morfológicos estruturais, como os túbulos seminíferos (estrela), com suas células da linhagem espermatogênica (seta curta) sem alterações. Como também não foi visto nenhuma alteração no interstício (asterisco) (Figura 8).

3.10. Imunohistoquímica

3.10.1. Citocinas Inflamatórias IL-6 e TNF- α

Para a IL-6 os animais do grupo GD foram os que apresentaram as maiores taxas dessa citocina pela quantificação em pixels, diferindo de todos os outros. Já os grupos GC, GDI, GDM e GDMS apresentaram valores menores, porém não diferindo entre si (Figura 9).

A marcação para TNF- α demonstrou que esse marcador inflamatório foi encontrado em maior quantidade no grupo GD diferindo de todos os grupos. E as taxas menores estavam presentes nos grupos GC, GDI e GDMS que não diferiram significativamente entre si (Figura 10).

3.10.2. Receptor de Andrógeno (RA)

Os grupos que apresentaram as maiores taxas de marcação para RA foram os grupos GC e GDI, que não diferiram entre si, porém diferiram de todos os outros grupos exceto do GDM. O grupo GD apresentou os menores valores diferindo de todos os outros. Já o GDMS apresentou-se com valores menores que o GC, porém bem maiores que o GD, diferindo de todos exceto do GDM (Figura 11).

Discussão

O estresse oxidativo é um agravante das complicações diabéticas, e este estava estabelecido nos grupos diabéticos no presente estudo. Além disso existe uma relação entre a

hiperglicemia e o estresse oxidativo. O estado hiperglicemiante do diabetes, com consequente aumento de ROS, reduz os níveis de óxido nítrico (NO) ativando a aldose redutase. E atua no aumento do fluxo de glicose pela via dos polióis, induzido pelo aumento de ROS, determinando maior conversão de glicose a sorbitol, reduzindo NADPH e glutathione (antioxidante intracelular) e aumentando o estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia. O sorbitol é convertido à frutose, resultando em um aumento da relação NADH: NAD⁺, que está associado com o aumento da síntese de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da proteína kinase C (PKC) (DARLEY-USMAR; WISEMAN; HALLIWELL, 1995). Isso demonstra que a hiperglicemia é uma causa do estresse oxidativo bem como este estresse agrava a hiperglicemia. Além disso essa cascata bioquímica também explica os baixos níveis de glutathione tecidual encontrados nos testículos dos animais somente induzidos ao diabetes, e mostra que a melatonina tanto aumentou os níveis desse antioxidante nos grupos já diabéticos como barrou o declínio dessa molécula em tratamentos simultâneos.

Segundo Reiter et al. (2003), essa ação antioxidante da melatonina parece agir por diferentes vias: como neutralizador direto de radicais livres; como antioxidante indireto via estimulantes de enzimas antioxidantes; aumentando a eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial e reduzindo o vazamento de elétrons (diminuindo, com isso, a geração de radicais livres); aumentando a eficiência de outros antioxidantes. No presente estudo a melatonina atuou provavelmente através da segunda via. Porém não conseguiu diminuir os níveis de moléculas pró-oxidantes, mas isso pode ser esclarecido devido ao fato que esse processo da cadeia oxidativa seja comparada a uma balança, que na homeostase está equilibrada entre as quantidades de agentes oxidantes e antioxidantes (SOUZA; MORAIS, 2016; TANIYAMA; GRIENGLING, 2003), então quando no diabetes há uma produção exagerada de TBARS que indica a instalação do estresse oxidativo, a melatonina entra aumentando os níveis de moléculas antioxidantes para tentar equilibrar novamente a balança (REITER, 2000; REITER et al.,

2003b). Por isso os níveis altos de TBARS vieram acompanhados de altos níveis de GSH.

A hiperglicemia e estresse oxidativo também estão associados na promoção do perfil inflamatório no diabetes. A hiperglicemia pode estar associada com uma elevação dos níveis circulantes de citocinas inflamatórias, esse aumento pode também estar associado ao aumento do estresse oxidativo (ESPOSITO et al., 2002). Isso pode ser explicado pela formação de produtos avançados da glicosilação não-enzimática (AGEs) que são proteínas ou lipídios que se tornam glicosilados pelo alto tempo de exposição a açúcares oxidados e contribuem para o avanço das complicações (BROWNLEE, 2005; GOLDIN et al., 2006). Algumas dessas moléculas modificadas ativam receptores de AGEs (RAGEs), estimulando a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e algumas prostaglandinas (REIS et al., 2012). Isso atesta alguns de nossos resultados que mostram o aumento do estresse oxidativo, glicose e consequente aumento dos níveis de IL-6 e TNF- α nos testículos de ratos diabéticos. E ainda nesse interim, é notório que a melatonina pôde agir diminuindo os níveis de estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias teciduais de forma independente e dependente de sua ação hipoglicemiante, visto que no grupo tratado com melatonina após a indução, não houve melhora na hiperglicemia, porém houveram melhores nos outros parâmetros e no grupo de tratamento simultâneo houve a ação hipoglicemiante e melhora nas outras análises.

A redução de peso em órgãos de animais são achados comuns no diabetes (RIBEIRO et al., 2006). O que atesta em parte nossos achados, que demonstrou uma diminuição do peso nos testículos direitos dos animais diabéticos, isso provavelmente está relacionado com baixos níveis de testosterona encontrado nestes animais. E a melatonina não demonstrou efetividade em diminuir essa perda de peso testicular, mesmo com concentrações normais de testosterona. Esses achados coadunam com os resultados de (GOBBO et al., 2015), que verificaram que a melatonina não alterou peso de testículos de ratos diabéticos tratados na mesma dosagem, isso

também independente dos níveis de andrógenos.

Muitas das modificações no peso de órgãos e em parâmetros histopatológicos visuais ocorrem em diabetes mais tardias com mais de trinta dias (SOARES et al., 2011; TRINDADE, 2010), isso explica o por que não houve modificações histopatológicas qualitativas nem diferenças significativas nos pesos dos animais de nenhum dos grupos experimentais.

Na altura média do epitélio o grupo GDMS conservou a altura epitelial que foi diminuída no GD. Essa capacidade de preservar morfometricamente estruturas que foram modificadas no diabetes também foi observada no trabalho de (COSTA, 2014) onde a melatonina reverteu o aumento da frequência epitelial, redução do volume do lúmen e frequência estromal elevada causadas pelo diabetes.

O peso dos animais foi diminuído pelo diabetes o que já é esperado, pois é umas das suas principais complicações (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014), além disso, foi observado que a insulina melhorou significativamente o ganho de peso o que também é relatado na literatura (HISSA; HISSA; BRUIN, 2001), porém nos grupos tratados com melatonina não foi visto aumento de peso em comparação ao grupo diabético. No trabalho feito por (ARMAGAN et al., 2006), foi observado também que a melatonina administrada em ratos diabéticos na mesma dosagem que a nossa não atuou modificando o peso corporal nos ratos tratados. Isso se deve ao fato que a melatonina não atua naturalmente no ganho de peso, e sim está relacionada mais na perda de peso, porém essa relação melatonina/peso é controversa principalmente relacionada com o diabetes (MOSTAFAVI et al., 2017).

Evidenciou-se também na análise imunohistoquímica para receptor de andrógenos que o grupo diabético (GD) foi o que apresentou menor marcação e o tratado com insulina (GDI) foi o que apresentou maior marcação para esse receptor o que já é notório na literatura, como exemplo do experimento feito por (BAHEY et al., 2014) onde foi observado que o grupo diabético

expressou menos receptores androgênicos que o grupo tratado com insulina. Já a melatonina administrada de forma simultânea apresentou níveis de marcação desse receptor maiores que o GD, porém menores que o grupo controle.

Acreditava-se até pouco tempo atrás que a melatonina tinha papel primordial na regulação da produção de testosterona, porém de forma inibitória, ou seja, diminuindo os níveis circulantes desse andrógeno (QIN et al., 2015). Porém dados recentes na literatura vêm demonstrando que essa indolamina pineal pode atuar estimulando a produção de testosterona, isso através de uma regulação Sertoli-Leydig (DENG et al., 2018; (YU et al., 2018). Porém os mecanismos moleculares dessa via de síntese estimulatória, ainda não estão claros. Isso pode explicar no nosso trabalho o aumento dos níveis de testosterona nos grupos tratados com essa indolamina.

Conclusão

Assim sendo a melatonina aplicada na dosagem de 10mg/kg em ratos diabéticos atuou diminuindo níveis glicêmicos, melhorando parâmetros morfométricos testiculares, aumentando níveis de glutathione reduzida (GSH), diminuindo a expressão de marcadores inflamatórios como IL-6 e TNF- α . Além de atuar aumentando níveis plasmáticos de testosterona total e receptor de andrógenos. Mostrando a partir disso o alto potencial terapêutico, entretanto, são necessárias mais avaliações para atestar a capacidade desse hormônio de se transformar em um agente alternativo.

4. Referência Bibliográfica

AGIL, A. et al. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Pineal Research**, v. 54, n. 4, p. 381–388, 1 maio 2013.

ALVES, M. G. et al. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 5, p. 626–635, maio 2013.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014.

ARMAGAN, A. et al. Effects of melatonin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat testis. **Asian Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 595–600, set. 2006.

BACCETTI, B. et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v. 17, n. 10, p. 2673–2677, 1 out. 2002.

BAHEY, N. et al. Influence of insulin and testosterone on diabetic rat ventral prostate: Histological, morphometric and immunohistochemical study. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 2, n. 3, p. 151, 2014.

BERTOLUCI, M. C. et al. Endothelial dysfunction in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 416–426, mar. 2008.

BOJUNGA, J. et al. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats. **Diabetologia**, v. 47, n. 12, p. 2072–2080, 1 dez. 2004.

BRADSHAW, E. M. et al. Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes Spontaneously Secrete Proinflammatory Cytokines Inducing Th17 Cells. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4432–4439, 1 out. 2009.

BROWNLEE, M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications**. Special Features. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/414813a>>. Acesso em: 4 maio. 2018.

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615–1625, 1 jun. 2005.

CARVALHO, O. F. DE et al. Oxidative effect of nitric oxide and male infertility. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 33–38, jan. 2002.

CHEN, Y.-L. et al. **Cytokine**, v. 94, p. 14–20, jun. 2017.

COSENTINO, F.; EGIDY ASSENZA, G. Diabetes and Inflammation. **Herz**, v. 29, n. 8, p. 749–759, dez. 2004.

COSTA, C. F. P. DA. **Baixas doses de melatonina exógena no diabetes experimental = implicações para a estrutura, função e defesa antioxidante do testículo e epidídimo de ratos = Low doses of exogen melatonin under experimental diabetes: implications for rat testicular and epididimal structure, function and antioxidant defense**. Dissertação (Mestrado)—Campinas: Universidade Estadual de Campinas -UNICAMP, 2014.

DALL'AGO, P. et al. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 7, p. 843–849, jul. 2002.

DARLEY-USMAR, V.; WISEMAN, H.; HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v. 369, n. 2–3, p. 131–135, 7 ago. 1995.

DOGAN, Y. et al. **Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in Insulin-Dependent Diabetic Children.** Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2006/059206/abs/>>. Acesso em: 22 maio. 2018.

DOGANAY, S. et al. Comparison of serum NO, TNF- α , IL-1 β , sIL-2R, IL-6 and IL-8 levels with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. **Eye**, v. 16, n. 2, p. 163–170, 2002.

ERBAĞCI, A. B. et al. Mediators of inflammation in children with type I diabetes mellitus: cytokines in type I diabetic children. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 645–650, nov. 2001.

ESPOSITO, K. et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. **Circulation**, v. 106, n. 16, p. 2067–2072, 15 out. 2002.

FAIRBURN, C. G.; MCCULLOCH, D. K.; WU, F. C. 9 The effects of diabetes on male sexual function. **Clinics in Endocrinology and Metabolism, Disease of Sex and Sexuality**. v. 11, n. 3, p. 749–767, 1 nov. 1982.

GOBBO, M. G. et al. Effect of Melatonin Intake on Oxidative Stress Biomarkers in Male Reproductive Organs of Rats under Experimental Diabetes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597–605, 8 ago. 2006.

HISSA, M. N.; HISSA, A. S. R.; BRUIN, V. M. S. DE. Tratamento do diabetes mellitus tipo 1 com bomba de infusão subcutânea contínua de insulina e insulina lispro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 5, p. 487–493, out. 2001.

HUSSAIN, M. J. et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. **Diabetologia**, v. 39, n. 1, p. 60–69, 1 jan. 1996.

JIANG, G. Y. Practical Diabetes. **In Beijing People's Health Publishing House.**, v. 295, 1996.

JIANG, T. et al. Protective Effects of Melatonin on Retinal Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Diabetic Retinopathy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–13, 2016.

KUZUYA, T. et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. **Diabetes research and clinical practice**, v. 55, n. 1, p. 65–85, 2002.

LA VIGNERA, S. et al. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. **Minerva Endocrinologica**, v. 34, n. 1, p. 1–9, mar. 2009.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–275, 1951.

LUE, T. F. et al. **Sexual Dysfunction in Diabetes.** Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279101/>>. Acesso em: 10 maio. 2018.

MORAIS, G. F. DA C. et al. O diabético diante do tratamento, fatores de risco e complicações crônicas. **Rev. enferm. UERJ**, p. 240–245, 2009.

MOSTAFAVI, S.-A. et al. Role of Melatonin in Body Weight: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 23, 27 set. 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, jun. 1979.

OMOLAOYE, T. S.; SKOSANA, B. T.; DU PLESSIS, S. S. Diabetes mellitus- induction: Effect of different streptozotocin doses on male reproductive parameters. **Acta Histochemica**, v. 120, n. 2, p. 103–109, fev. 2018.

OZGUNER, F.; BARDAK, Y.; COMLEKCI, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A comparative study. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 282, n. 1, p. 83–88, 1 jan. 2006.

PINHEIRO, L. S.; DE MELO, A. D.; ANDREAZZI, A. E. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. **Scand. J. Lab. Anim. Sci.**, v. 38, n. 2, p. 12, 2011.

PORTO, E. M. et al. Lobe variation effects of experimental diabetes and insulin replacement on rat prostate. **Microscopy Research and Technique**, v. 74, n. 11, p. 1040–1048, 20 abr. 2011.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation. **Biochemical Pharmacology**, Inflammation 2010 - Inflammatory Cell Signaling Mechanisms as Therapeutic Targets. v. 80, n. 12, p. 1844–1852, 15 dez. 2010.

RAMALHO-SANTOS, J.; AMARAL, S.; OLIVEIRA, P. J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. **Current diabetes reviews**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2008.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 7, p. 1096–1105, 2008.

REIS, J. S. et al. Oxidative stress and interleukin-6 secretion during the progression of type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, n. 7, p. 441–448, 2012.

REITER, R. J. Melatonin: Lowering the High Price of Free Radicals. **Physiology**, v. 15, n. 5, p. 246–250, 1 out. 2000.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. v. 50, p. 20, 2003a.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 4, p. 1129–1146, 2003b.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **Journal of Pineal Research**, v. 61, n. 3, p. 253–278, 1 out. 2016.

REZVANFAR, M. R. et al. Effect of bedtime melatonin consumption on diabetes control and lipid profile. **International Journal of Diabetes in Developing Countries**, v. 37, n. 1, p. 74–77, mar. 2017.

RIBEIRO, D. L. et al. Prostatic stromal microenvironment and experimental diabetes. **European Journal of Histochemistry**, v. 50, n. 1, p. 51–60, 2006.

SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 263–267, set. 2004.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 68, n. 25, p. 192–205, 1968.

SOARES, L. C. et al. Histomorfologia de órgãos-alvo de ratos diabéticos suplementados com noni (*Morinda citrifolia*). **ConScientiae Saúde**, v. 10, n. 4, 28 dez. 2011.

SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 13, n. 5, p. 4831–4839, 2016.

SUDNIKOVICH, E. J. et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 180–187, 27 ago. 2007.

TAKASHIBA, K. S. et al. Morfologia testicular de ratos Wistar obesos sedentários e submetidos a treinamento físico. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 33, n. 1, 2011.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 1 dez. 2003.

TEIXEIRA, A. **Propriedades antioxidantes da melatonina: inibição de enzimas pró-oxidantes e ação contra a peroxidação lipídica**. Dissertação (Mestrado)—Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

TRINDADE, A. A. T. **ALTERAÇÕES TESTICULARES NO DIABETES ALOXÂNICO NO RATO ESTUDO MORFOMÉTRICO E ULTRAESTRUTURAL DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, 2010.

YU, K. et al. Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 447, 17 fev. 2018.

ZHANG, H.-M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. **Journal of Pineal Research**, v. 57, n. 2, p. 131–146, 1 set. 2014.

ZIAEI-RAD, M.; VAHDANINIA, M.; MONTAZERI, A. Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 50, 2010.

5. Anexos

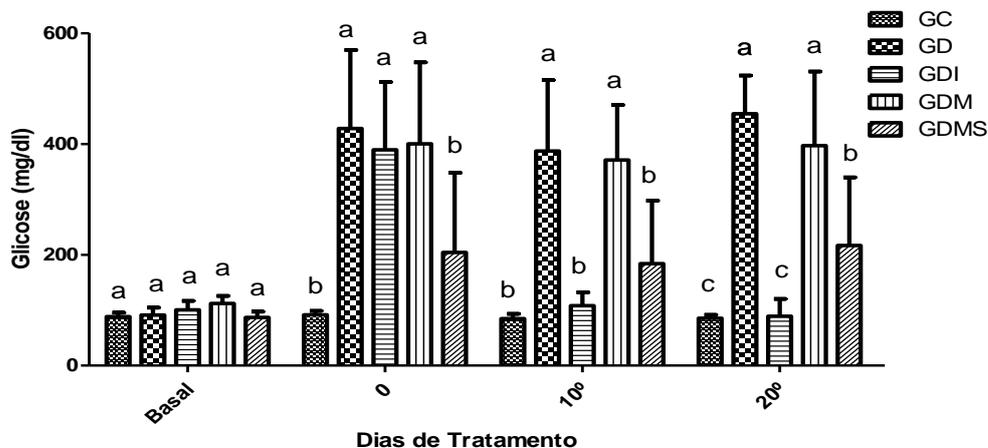


Figura 1. Níveis de glicose (mg/dl). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

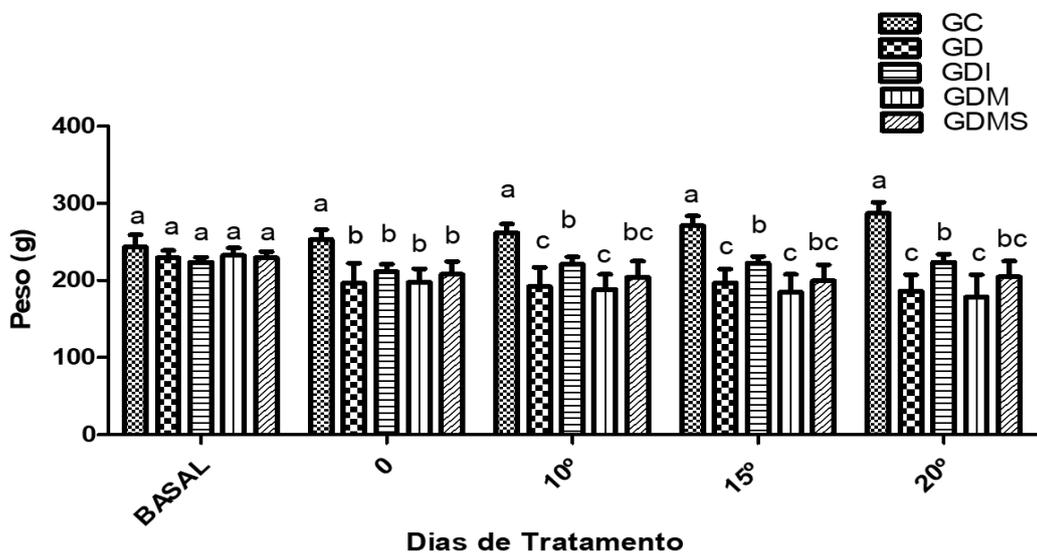


Figura 2. Peso dos animais dos grupos experimentais (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$)

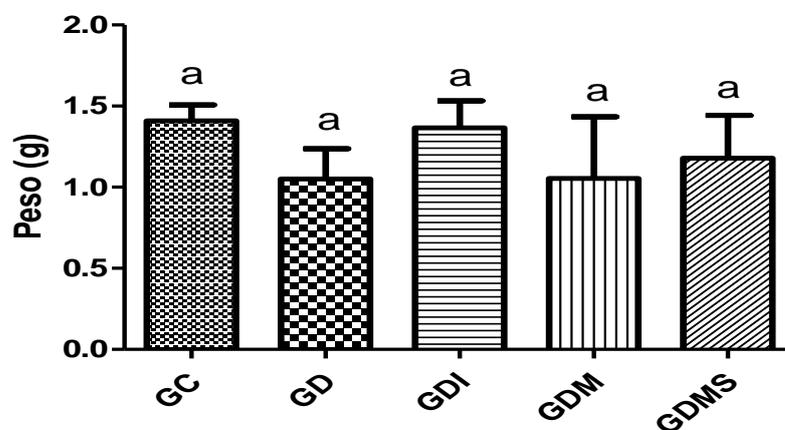


Figura 3. Peso dos testículos dos grupos experimentais (g). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

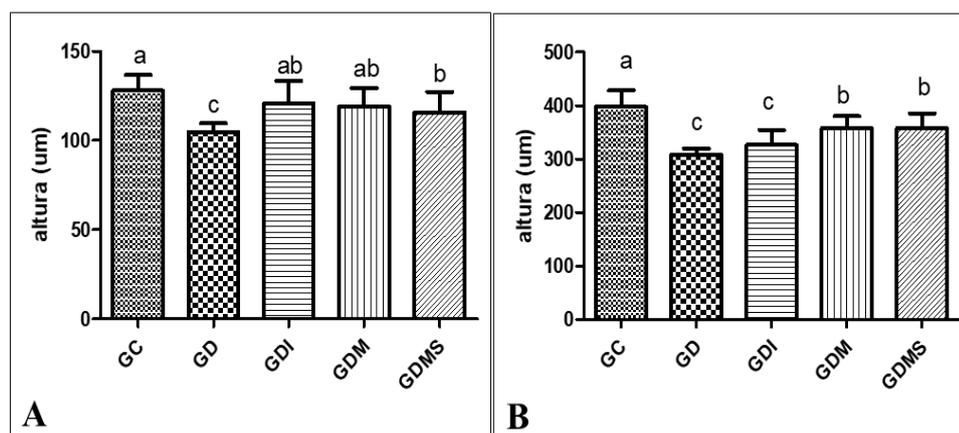


Figura 4. Altura média do epitélio testicular (A) e Diâmetro tubular médio testicular (B) (μm). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$)

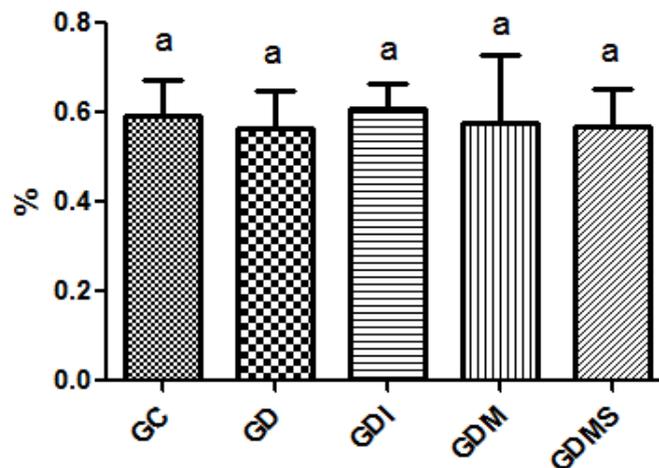


Figura 5. Índice organossomático (%). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

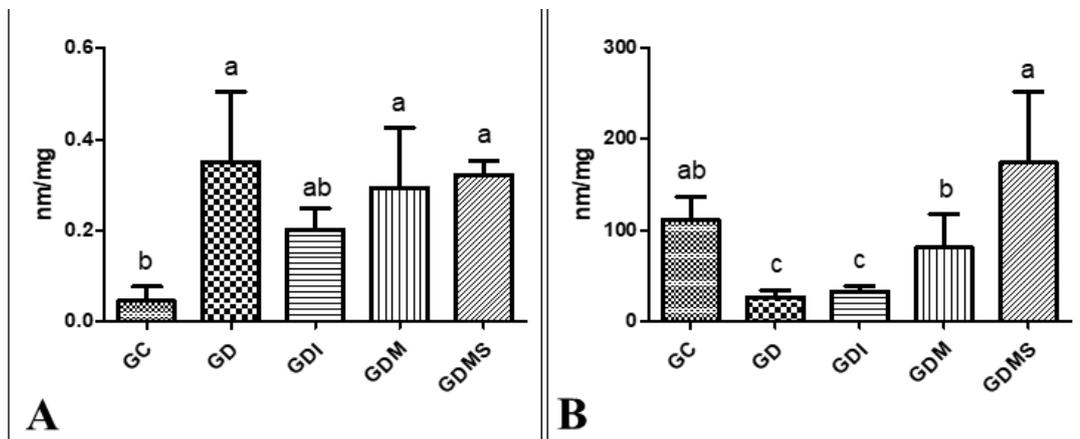


Figura 6. Análise do Estresse Oxidativo. (A) Níveis de TBARS testicular (nm/mg); (B) Níveis de glutathiona (GSH) testicular (nm/mg). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

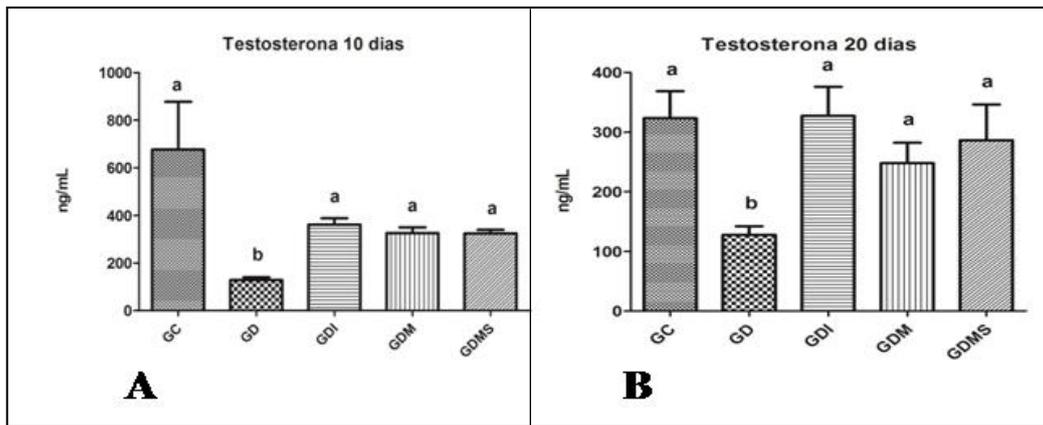


Figura 7. Níveis séricos de testosterona total no décimo (A) e vigésimo (B) dia de tratamento dos animais dos grupos experimentais (ng/mL). GC- grupo controle; GD- grupo diabético; GDI- grupo diabético tratado com insulina; GDM- grupo diabético tratado com melatonina; GDMS- grupo diabético tratado com melatonina simultânea. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$)

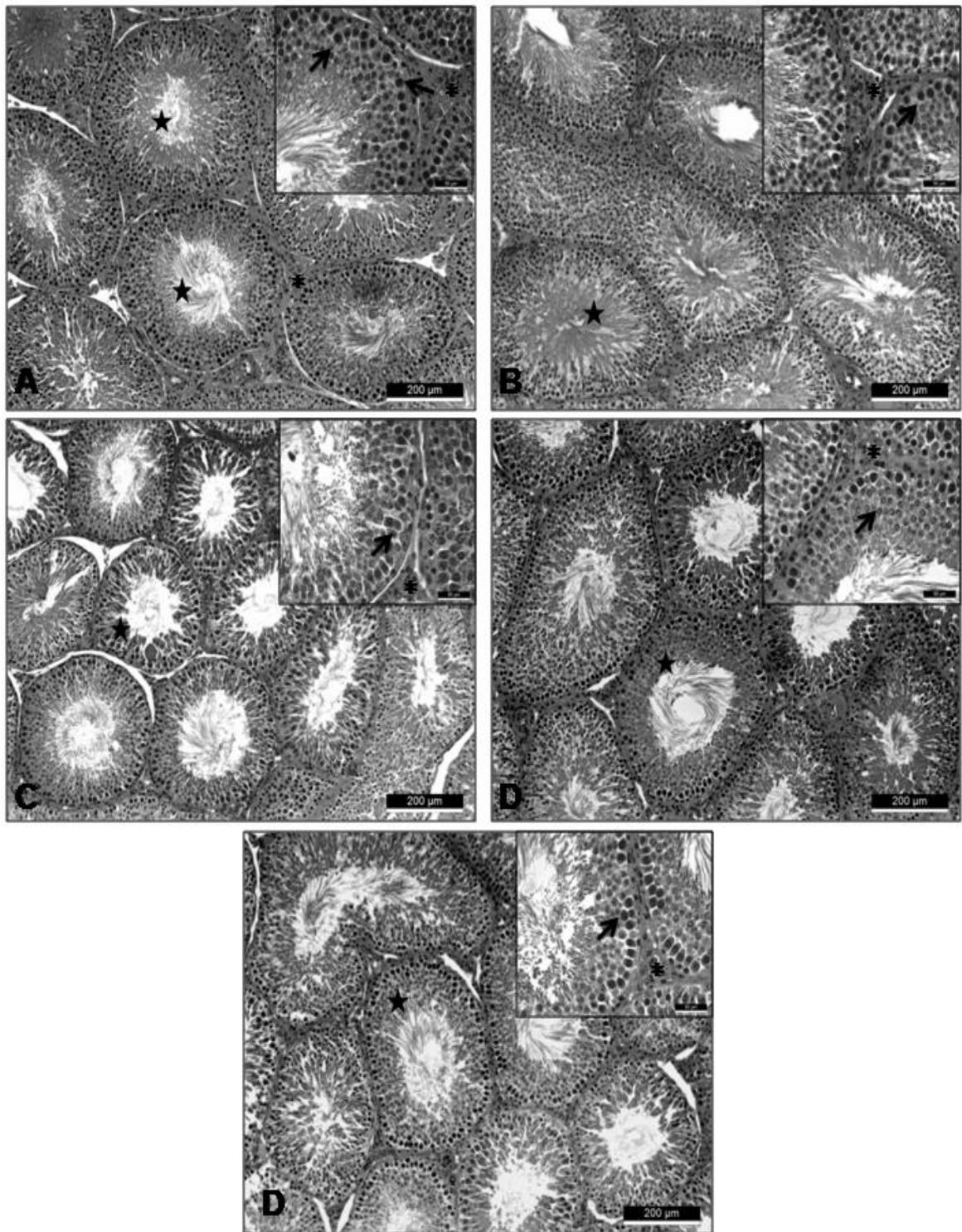


Figura 8. Secção transversal dos túbulos seminíferos de ratos Wistar adultos dos grupos experimentais corado com hematoxilina-floxina. A) GC- Grupo controle, B) GD- Grupo diabético; C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina; D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina; E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea. Observar túbulos seminíferos (estrela); células da linhagem espermatozóica (seta) e interstício (asterisco).

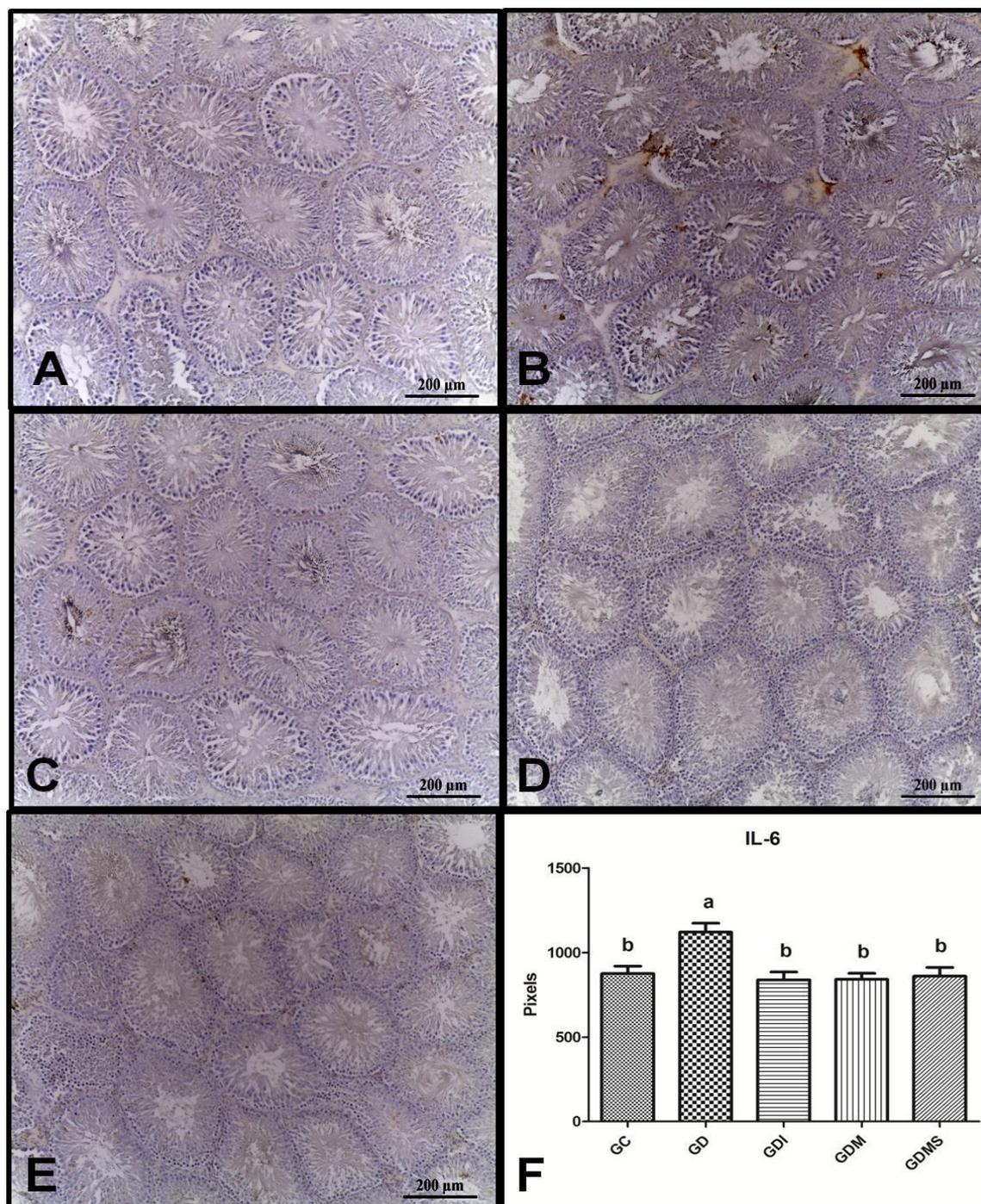


Figura 9. Imunohistoquímica para IL-6 nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom da IL-6. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

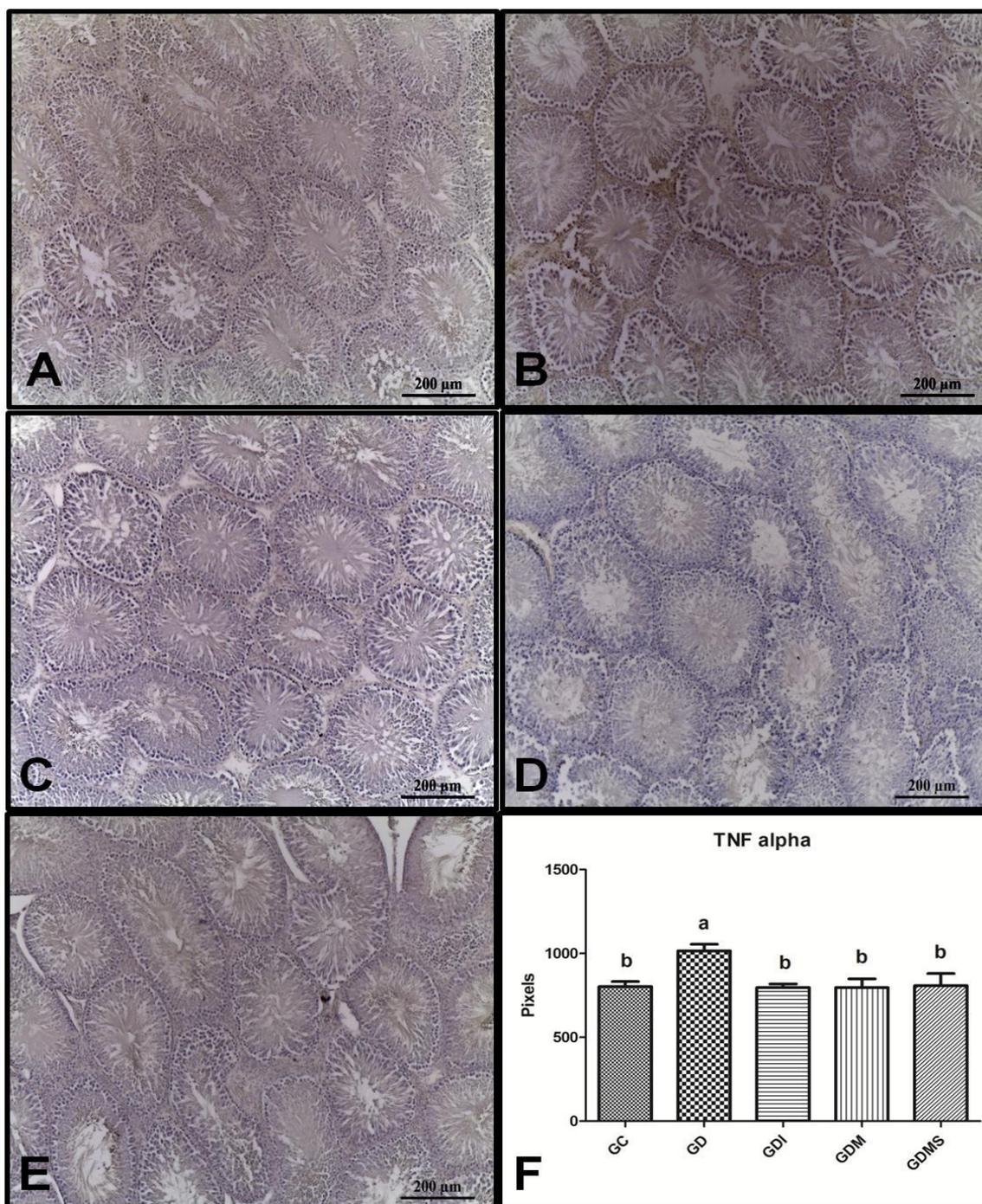


Figura 10. Imunohistoquímica para TNF- α nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom do TNF- α . *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

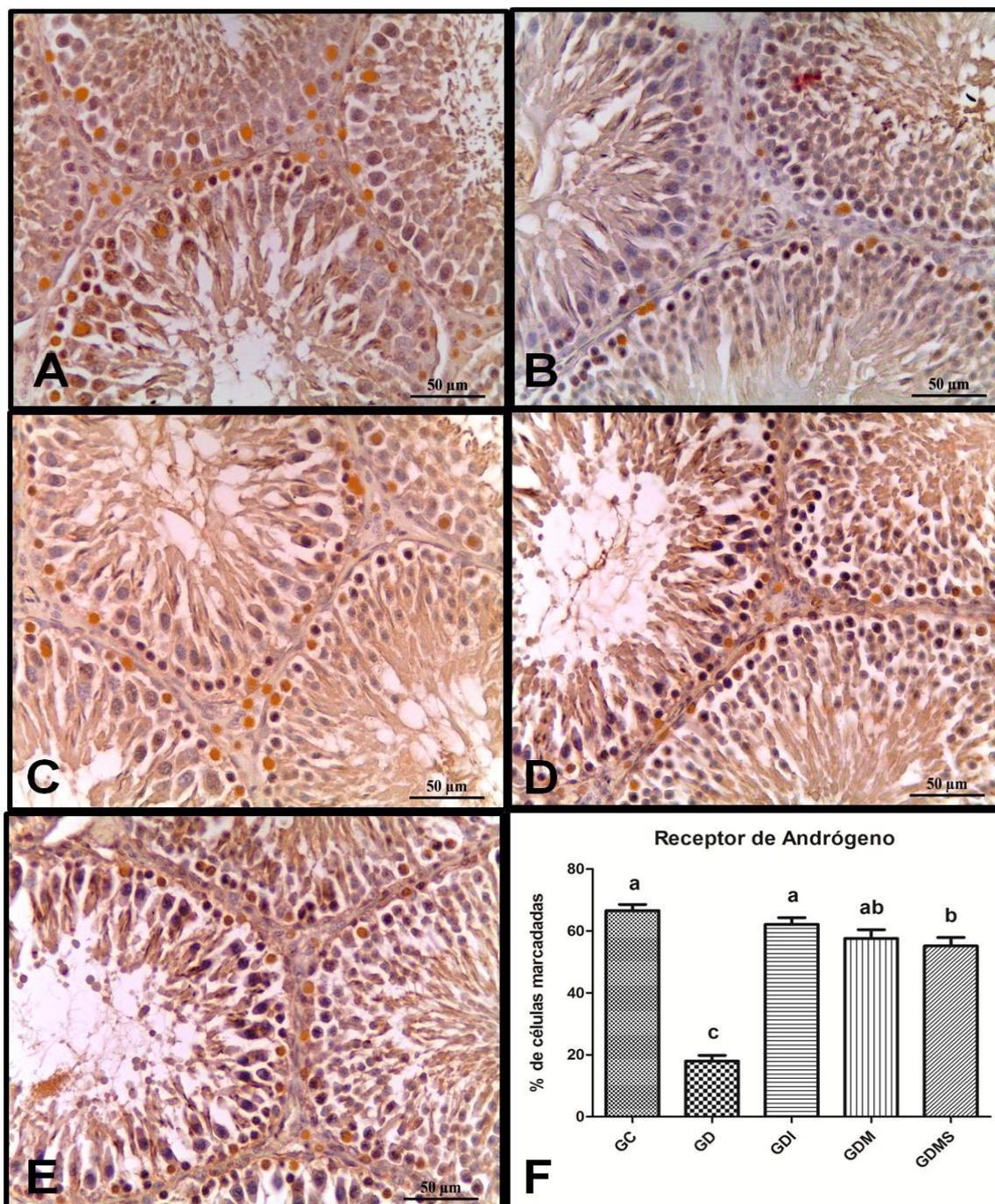


Figura 11. Imunohistoquímica para receptor de andrógenos nos testículos dos animais dos grupos experimentais – Objetiva 40X. A) GC- Grupo controle B) GD- Grupo diabético C) GDI- Grupo diabético tratado com insulina D) GDM- Grupo diabético tratado com melatonina, e E) GDMS- Grupo diabético tratado com melatonina simultânea F) Gráfico da quantificação em pixels da marcação positiva em marrom do receptor de andrógenos. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0.05$).

