



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL – PPGBA

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

**EFEITO DA MELATONINA ASSOCIADA À SINVASTATINA NO
TRATAMENTO DE RATOS INDUZIDOS À HIPERLIPIDEMIA**

RECIFE
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PRPPG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL – PPGBA

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

EFEITO DA MELATONINA ASSOCIADA À SINVASTATINA NO
TRATAMENTO DE RATOS INDUZIDOS À HIPERLIPIDEMIA

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

Orientador:

Prof^a. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Prof. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

RECIFE

2017

LAÍSE DE SOUZA ELIAS

**EFEITO DA MELATONINA ASSOCIADA À SINVASTATINA NO
TRATAMENTO DE RATOS INDUZIDOS À HIPERLIPIDEMIA**

Aprovada em 09 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador)

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

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite - UFRPE

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho – UFPE

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, o guia da minha vida! Que tem me abençoado de forma infinita com paciência, coragem, determinação e perseverança nesses anos de luta.

Aos meus pais, Simone Souza e José Newton, por tanto amor e atenção! Vocês são os meus maiores tesouros, minha maior riqueza. À vocês, eu devo tudo o que eu sou, serei eternamente grata por tudo!

Aos meus irmãos, Leandro Souza e Shirlane Amâncio (prima-irmã), pelo apoio e força de sempre!

À Stevam Gabriel, meu marido, obrigado por todo apoio, paciência, ajuda e compreensão nos melhores e piores momentos. Você demonstrou em cada momento da execução dessa tese que é meu amigo, meu companheiro, meu ombro amigo. Te amo e agradeço a Deus por sua vida!

Aos meus orientadores, Prof^a Álvaro Aguiar e Valéria Wanderley, pela oportunidade que me foi dada desde graduação, por não ter desistido de mim mesmo quando dei motivos, pela paciência, compreensão e ensinamentos durante todo esse tempo de convivência. Vocês são os grandes responsáveis pelo meu crescimento profissional. Obrigada por tudo.

Ao meu co-orientador, Léucio Duarte, por todo apoio, paciência, ensinamentos, dedicação, empenho e colaboração. Obrigado por todo tempo despendido para me ajudar, mesmo quando se tinha um mundo esperando por você. Com certeza, esse trabalho não seria o mesmo sem a sua contribuição! Ah, as conversas sobre cervejas e futebol ficarão marcadas!

Aos meus amigos de laboratório: Aline Mariano, Carolline Guimarães, Cintia Giselle, Clovis Lapa e Welma Emídio. Obrigada por toda ajuda, apoio, contribuição, por ouvir meus momentos de desespero, por tantos motivos de sorrisos. Vocês foram fundamentais na execução desse trabalho. Vocês foram verdadeiros anjos em minha vida! Muito obrigada por tudo!

Aos meus monitores de Histologia da Nassau, Fabiana Camargo, Fernanda Amorim, Isabela, Gilberto Fialho e Maria Paula por toda ajuda

quando precisei. Nossa troca de conhecimentos foi ótima! Falando em Nassau, muito obrigada, Hayanna Arruda e Davison Arruda por me socorrer nos momentos de desespero. Vocês são grandes amigos!

À amiga Dani Dutra, por me acompanhar por toda essa jornada acadêmica. Compartilhamos sorrisos, choros, angústias e tantos momentos, e será assim para todo sempre.

À família CAV, especialmente a Carolina Peixoto, Ewerton Fylipe e Taciana Rocha. Obrigada por tanta compreensão, ajuda e empatia nesse momento final da minha tese. Saber que poderia contar com vocês nesse momento tornou a jornada mais fácil e tranquila.

Ao laboratório de Histologia, obrigada a todos pelos momentos compartilhados juntos!

À todos do laboratório de Fisiologia renal da UFPE, especialmente a Linaldo, Regina, Juliana, Nielson, agradeço de coração toda contribuição e ajuda de vocês.

Agradeço imensamente a técnica Maria Edna por toda amizade, gentileza e suporte.

Agradeço aos bioteristas André e Renata por todo suporte que me deram com os animais e pela imensa consideração que sempre tiveram comigo. Obrigada de coração.

Aos amigos, Gabriela Barbosa e todos da Belezinha por compartilhar tantos momentos. Vocês tornam meus dias mais alegres!

Agradeço a CAPES pela concessão da bolsa e a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em especial ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) Laboratório de Histologia por todo apoio na execução desse projeto.

Enfim, agradeço a todos que direta e indiretamente contribuíram na execução deste projeto.

RESUMO

A hiperlipidemia é caracterizada por uma anormalidade no perfil lipídico, que por sua vez, pode sofrer oxidação, e consequentemente levar a um processo inflamatório. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a associação da melatonina à sinvastatina em ratos induzidos à hiperlipidemia, através de parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo, perfil inflamatório e histoquímica de fígado e rins. Utilizou-se 35 ratos com 150 dias de idade, estes foram divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução à hiperlipidemia; GI: ratos induzidos à hiperlipidemia pelo Triton WR 13339 e tratado com placebo; GIS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com sinvastatina; GIMs: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina simultaneamente; GIMSS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina e sinvastatina simultaneamente; GIM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina; GIMS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina e sinvastatina. A hiperlipidemia foi induzida pela administração de Triton WR 1339 (400 mg/kg i.p.) por quinze dias, a sinvastatina (40mg/kg s.c.) e a melatonina (10mg/kg) administrada na água de beber. Foi realizada a análise bioquímica dos seguintes parâmetros: HDL, LDL, triglicerídeos, colesterol total, VLDL, ALT, TGO, TGP, creatinina e ureia. O estresse oxidativo hepático e renal foi avaliado através da mensuração da peroxidação lipídica e níveis de glutathione reduzida, além da mensuração das enzimas catalase e superóxido desmutase. Para análise do perfil inflamatório, foi realizada a quantificação dos níveis de PCR, a imunohistoquímica para IL-6 e TNF- α e expressão das MMP- 2 e 9 no tecido renal. Além disso, foi realizada a histoquímica hepática e renal através da técnica de PAS e Picrosirius, respectivamente. Os resultados mostraram que os animais dos grupos tratados com melatonina e sinvastatina, associados ou não, apresentaram níveis de HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos, colesterol total, TGO e TGP e proteinúria reduzidos, além disso, a análise do estresse oxidativo demonstrou níveis de TBARS hepático e renal reduzidos, além da elevação dos níveis de GSH, catalase e superóxido desmutase, com resultados mais significativos nos grupos GIMSS e GIMS. Com relação a imunomarcagem para IL-6 E TNF- α no tecido renal, foi demonstrada que o tratamento com MEL isolada ou administrada simultaneamente com a sinvastatina apresentou efeitos mais expressivos na redução desses marcadores inflamatórios, concordando com a diminuição dos níveis de PCR. Por fim, a melatonina administrada de forma isolada ou combinada com a sinvastatina provocou um aumento na expressão das MMP-2 e MMP-9, consequentemente uma redução nos níveis de colágeno no tecido renal e aumento do glicogênio hepático. Diante dos nossos resultados, afirma-se que a combinação de melatonina e sinvastatina foi eficiente na proteção contra a injúria hepática e renal provocada pela hiperlipidemia, através da redução do estresse oxidativo, marcadores inflamatórios, perfil bioquímico e degradação da matriz.

Palavras-chave: hiperlipidemia, melatonina, sinvastatina, estresse oxidativo, inflamação.

ABSTRACT

Hyperlipidemia is characterized by an abnormality in the lipid profile, which in turn may undergo oxidation, and consequently lead to an inflammatory process. Thus, the present study aimed to evaluate the association of melatonin to simvastatin in rats induced to hyperlipidemia, through biochemical parameters, oxidative stress, inflammatory profile and histochemistry of liver and kidneys. 35 rats with 150 days of age were used, these were divided into the following groups: GC: rats without induction to hyperlipidemia; GI: rats induced to hyperlipidemia by Triton WR 13339 and treated with placebo; GIS: rats induced to hyperlipidemia and treated with simvastatin; GIMs: mice induced to hyperlipidemia and treated with melatonin simultaneously; GIMsS: mice induced to hyperlipidemia and treated with melatonin and simvastatin simultaneously; GIM: rats induced to hyperlipidemia and treated after with melatonin; GIMs: mice induced to hyperlipidemia and treated after with melatonin and simvastatin. Hyperlipidemia was induced by administration of Triton WR 1339 (400 mg / kg i.p.) for fifteen days, simvastatin (40 mg / kg s.c.) and melatonin (10 mg / kg) administered in the drinking water. Biochemical analysis of the following parameters was performed: HDL, LDL, triglycerides, total cholesterol, VLDL, ALT, TGO, TGP, creatinine and urea. Hepatic and renal oxidative stress was evaluated by measuring lipid peroxidation and reduced levels of glutathione, in addition to the measurement of the catalase and superoxide desmutase enzymes. For the analysis of the inflammatory profile, quantification of CRP levels, immunohistochemistry for IL-6 and TNF- α and expression of MMP-2 and 9 in renal tissue were performed. In addition, hepatic and renal histochemistry was performed by PAS technique and Picrosirius, respectively. The results showed that the animals in the groups treated with melatonin and simvastatin, associated or not, presented levels of HDL, LDL, VLDL, triglycerides, total cholesterol, TGO and TGP and reduced proteinuria, in addition, the oxidative stress analysis showed levels of Reduced hepatic and renal TBARS, in addition to elevated levels of GSH, catalase and superoxide desmutase, with more significant results in the GIMsS and GIMs groups. Regarding the immunostaining for IL-6 and TNF- α in renal tissue, it has been shown that treatment with MEL alone or given simultaneously with simvastatin had more expressive effects on the reduction of these inflammatory markers, in agreement with the decrease in CRP levels. Finally, melatonin administered alone or in combination with simvastatin resulted in an increase in the expression of MMP-2 and MMP-9, consequently a reduction in collagen levels in renal tissue and increase in hepatic glycogen. In view of our results, the combination of melatonin and simvastatin has been shown to be effective in protecting against hepatic and renal injury caused by hyperlipidemia, through the reduction of oxidative stress, inflammatory markers, biochemical profile and matrix degradation.

Keywords: hyperlipidemia, melatonin, simvastatin, oxidative stress, inflammation

Sumário

Capítulos		Pág.
I	1. INTRODUÇÃO	15
	2. REVISÃO DE LITERATURA	15
	2.1. Hiperlipidemia.....	16
	2.2. Oxidação lipídica.....	17
	2.3. Marcadores inflamatórios.....	20
	2.4. Estresse oxidativo.....	24
	2.5. Modelo experimental da hiperlipidemia.....	31
	2.6. Tratamento da hiperlipidemia.....	33
	2.7. Melatonina.....	37
	3. REFERÊNCIAS	43
II	Efeito hepatoprotetor da sinvastatina associada à melatonina em ratos induzidos à hiperlipidemia.....	55
	RESUMO.....	55
	INTRODUÇÃO.....	56
	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	66
III	Melatonina associada à sinvastatina protege a histofisiologia renal de ratos submetidos à hiperlipidemia	82
	RESUMO.....	82
	INTRODUÇÃO.....	83
	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFMK (N¹-ACETIL-N²-FORMIL-5-METOXIQUNURAMINA)

ALT (Alanina aminotransferase)

AMK (N¹]-ACETIL-5- METOXIQUNURAMINA)

AMPC (adenosinamonofosfato cíclico)

AST (aspartato transaminase)

ATO (atorvastatina)

BAX (associated protein X)

BSA (albumina sérica bovina)

CAT (catalase)

CCL4 (tetracloreto de carbono)

COX-2 (ciclo-oxigenase 2)

CT (colesterol total)

DCV (doença cardiovascular)

DNA (ácido desoxirribonucleico)

ENOS (óxido nítrico sintetase endotelial)

ERN (espécies reativas de nitrogênio)

EROS (espécies reativas de oxigênio)

GLUT-4 (transportador de glicose- 4)

GPX (glutathione peroxidase)

GSH (glutathione reduzida)

HDL (lipoproteína de alta densidade)

HIOMT (hidroxindol-o-metiltransferase)

HMG-COA (hidrometilglutaril- CoA)

HTP (triptofanohidroxilase)

HTPD (hidroxitriptofano descarboxilase)

ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1)

IFN γ (interferon gama)

IL (interleucina)

LDL (lipoproteína de baixa densidade)

LDLOX (lipoproteína de baixa densidade oxidada)

MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1)

M-CSF (fator estimulante de colônia de macrófago)

MEL (melatonina)

MMP (metaloproteinase)

MT (receptor de melatonina)

NADPH OXIDASE (fosfato de dinucleotídeo de adenina oxidase)

NAT (N- acetiltransferase)

NFKB (fator nuclear kappa B)

NK (células natural Killer)

NO (óxido nítrico)

NSQS (núcleosupraquiasmático)

OMS (organização mundial da saúde)

PAI-1 (Inibidor do ativador do plasminogênio)

PBS (phosphate buffer solution)

PCR (proteína C reativa)

PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)

PVDF (fluoreto de polivinilideno)

QR (quinona redutase)

RNAM (RNAmensageiro)

SOD (superóxido desmutase)

TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TF (fator tecidular)

TG (triglicerídeos)

TGF- α (fator de transformação de crescimento alfa)

TGF- β (fator de transformação de crescimento beta)

TIMP (fator inibidor de metaloproteinase)

TNF- α (fator de necrose tumoral)

VCAM (molécula de adesão de células vasculares)

VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade)

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1: Oxidação do LDL.....	20
Figura 2: PCR e inflamação	22
Figura 3: Etiologia do processo inflamatório.....	24
Figura 4: Efeitos celulares dos ânions superóxidos e seus derivados.....	27
Figura 5: Sistema de defesa antioxidante enzimática	30
Figura 6: Efeitos das estatinas na biossíntese do colesterol.....	34
Figura 7: Fórmula estrutural da sinvastatina	36
Figura 8: Biossíntese da melatonina.....	38

Capítulo II

Figura 1: Gráfico dos valores de proteína C reativa (mg/mL) de proteína dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).....	75
Figura 2: Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$).....	76
Figura 3: Avaliação dos níveis de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas	

pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....77

Figura 4: Avaliação da enzima antioxidante catalase ($\mu\text{mol/mg}$ de tecido) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....78

Figura 5: Avaliação da enzima antioxidante superóxido desmutase (RLU/mg de tecido) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....79

Figura 6: Fotomicrografia de fígado evidenciando glicogênio hepático corado pelo Ácido Periódico de Schiff. (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....80

Capítulo III

Figura 1: Gráfico dos valores de creatinina (mg/dL) nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....98

Figura 2: Gráfico dos valores de ureia (mg/dL) dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....99

Figura 3: Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (nmol/mg de proteína) no tecido renal dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....100

Figura 4: Avaliação dos níveis de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	101
Figura 5: Imunohistoquímica para IL-6 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	105
Figura 6: Imunohistoquímica para TNF- α do tecido renal dos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	103
Figura 7: Quantificação das fibras colágenas do tecido renal dos diferentes grupos experimentais. (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	104
Figura 8: Expressão da MMP-2 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	105
Figura 9: Expressão da MMP-9 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais (GC-GIMS) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p<0,05$).....	106

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1: Valores dos níveis bioquímicos da função hepática nos animais dos grupos experimentais antes da indução da hiperlipidemia94

Tabela 2: Valores dos níveis bioquímicos da função hepática nos animais dos grupos experimentais após tratamento.....94

1. INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia é caracterizada como uma alteração metabólica que se dá quando os níveis de lipídios circulantes estão aumentados na corrente sanguínea (COSTA; SILVA, 2002). Essa produção desregulada de na corrente sanguínea, pode acarretar sérios problemas, como de obstrução das paredes do vaso sanguíneo, hipertensão arterial, além de danos em diferentes órgãos e tecidos (KOLANKIEWICZ et al., 2008), caracterizando, um grave problema de saúde pública (BOTREL, 2000).

Essa anormalidade lipídica, por sua vez, provoca agressão endotelial, e como consequência, estresse oxidativo e alterações metabólicas da matriz, entre outros distúrbios (SIGNORI et al., 2007). Além disso, uma vez aumentado os níveis de lipídios na corrente sanguínea é iniciado uma cascata inflamatória, de modo que, interleucinas, citocinas e enzimas modificadoras de matrizes intercelulares interagem com diversos tipos celulares promovendo alterações que levam à formação de células espumosas, estrias gordurosas e da placa ateromatosa (LIBBY, 2002).

Embora as modificações de estilo de vida, como exercício físico e dieta, sejam importantes para indivíduos com anormalidades lipídicas, estas intervenções, em geral, não são suficientes. Dessa forma, nas últimas décadas, a busca de novos medicamentos para o tratamento da hiperlipidemia tem valorizado o papel de substâncias que ajudem no controle do aumento do perfil lipídico e da inflamação, além de proteger o endotélio vascular contra o estresse oxidativo (BRUSQ et al., 2006).

Atualmente, as estatinas são os fármacos mais efetivos no tratamento da hipercolesterolemia. Estes fármacos atuam na via limitante da síntese do colesterol, inibindo a ação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA Redutase) (WURTZ et al., 2016). A sinvastatina é um membro da classe desse fármaco, sendo a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil (GRAESER et al., 2008) por apresentar um menor custo e maior efetividade (ARAUJO et al., 2011).

Apresentando atividade antioxidante, encontramos a melatonina (MEL) ou N-acetil-5-metoxitriptamina, sendo sintetizada pela glândula pineal dos vertebrados (BONNEFONT-ROUSSELOT & COLLIN., 2010). Este hormônio apresenta a capacidade de sequestrar as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN), atuando na prevenção ao dano oxidativo (ALVES et al., 2004). Hussain (2007)

demonstrou que a administração de MEL inibe a absorção de colesterol e poderia ser um auxiliar no tratamento da hipercolesterolemia, por diminuir o colesterol plasmático, o perfil lipoprotéico e o conteúdo lipídico do fígado. Além disso, a MEL ainda apresenta efeitos anti-inflamatórias e antiapopticos (CHEN et al., 2015; SHIN et al., 2015; CHEN et al, 2016).

Levando em consideração que a associação de hipolipemiantes é de extrema relevância, devido ao fato que a inibição dupla causa uma redução mais efetiva de LDL-colesterol (STEIN, 2002), e sabendo que a melatonina exerce efeitos hipolipemiante, além de atuar como o mais potente antioxidante natural e no processo inflamatório (AGIL et al, 2013), considera-se a hipótese de que a reposição crônica de melatonina associada à administração da Sinvastatina em ratos com 150 dias de idade possa reduzir os biomarcadores inflamatórios, do estresse oxidativo, peroxidação lipídica, além das alterações histológicas no tecido hepático e renal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIPERLIPIDEMIA

As hiperlipidemias têm sido exaustivamente estudadas devido à sua forte relação com as DCV (MARTINEZ, 2003). Com exceção da idade, a hiperlipidemia, principalmente em relação às altas concentrações de LDL-C e baixas de HDL-C, é o fator preditivo mais importante para o desenvolvimento de DCV e de suas complicações (VAPAATALO & MERVAALA, 2001; MARTINEZ, 2003; FORTI & DIAMENT, 2006).

O termo dislipidemia pode ser definido como uma anormalidade lipídica caracterizada por um aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), triglicerídeos ou diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) no soro, isoladamente ou associadas (SOUZA et al., 2013).

Essas alterações podem apresentar etiologia oriunda de fatores genéticos, classificando como hiperlipidemia primária; e causada por fatores ambientais como dieta, medicamentos, doenças e idade. Caracterizando a hiperlipidemia secundária (BERTOLINI; BAZOTTE, 2002).

Para a classificação fenotípica ou bioquímica, são considerados os níveis plasmáticos de colesterol total (CT), LDL-C, triglicerídeos (TG) e HDL-C. Estas

dosagens bioquímicas compreendem o perfil lipídico (SBC, 2007). É recomendável que esta caracterização laboratorial das hiperlipidemia seja feita no indivíduo com um estado metabólico estável, em dieta habitual, sem atividade física e ingestão de álcool pelo menos 24 e 72 horas antes da coleta do sangue, respectivamente, e sem medicação hipolipemiante há pelo menos quatro semanas antes do exame (MARTINEZ, 2004).

Segundo a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), de acordo com o perfil lipídico apresentado, as hiperlipidemia podem ser classificadas laboratorialmente da seguinte forma: 1) Hipercolesterolemia isolada (caracterizada pelo aumento do colesterol total e ou LDL); 2) Hipertrigliceridemia isolada (aumento dos níveis de triglicerídeos); 3) Hiperlipidemia Mista (aumento do colesterol total e triglicerídeo); 4) Diminuição isolada do HDL ou associada ao aumento dos triglicerídeos e colesterol total.

A relevância da hiperlipidemia como problema de saúde pública está na sua relação com as doenças cardiovasculares (DCV). Estimativas feitas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) preveem que as DCV continuarão sendo as principais causas de morbi-mortalidade até o ano de 2020, especialmente nas sociedades afluentes dos países em transição econômica (BOTREL et al, 2000).

2.2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A modificação oxidativa das partículas de LDL é considerada um dos principais eventos na indução e progressão das DCVs. Os resultados de estudos experimentais e epidemiológicos têm sugerido que a maior taxa de lipoperoxidação está associada às doenças cardiovasculares (KRITHARIDES & ESTOCKER, 2002; PETROVAN et al., 2007).

Os níveis elevados de lipoproteína na corrente sanguínea acarreta o acúmulo de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na matriz subendotelial da camada íntima das artérias (BARTER, 2005). Como a lipoproteína fica retida na camada íntima por uma trama de fibras e fibrilas secretadas pelas células parietais e fica afastada dos antioxidantes plasmáticos, torna-se propensa a sofrer reações de oxidação, tanto da sua porção lipídica como a sua porção proteica (PULINILKUNNIL et al., 2003).

Com isso, uma vez retida no espaço subendotelial, a LDL poderá ser quimicamente modificada, contribuindo, assim, para o processo inflamatório, tais modificações incluem a sua oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SINGH; JIALAL, 2006), produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas, modificando sua estrutura, formando a LDL oxidada (LDLox) (STEFFENS; MACH, 2004). Nesta fase, os lipídios da LDL são adicionalmente oxidados e a parte proteica também é modificada, impedindo o reconhecimento da lipoproteína pelo receptor de LDL, tornando-a reconhecível apenas pelos receptores presentes nos macrófagos e células musculares lisas (BROWN; GOLDSTEIN, 2009).

A LDLox estimula a camada de células endoteliais a produzir moléculas de adesão celular como VCAM-1 (molécula-1 de adesão da célula vascular), ICAM-1 (molécula-1 de adesão intercelular), fatores de crescimento, tal como M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófago) e proteínas quimiotáticas, como MCP-1 (proteína-1 quimiotática para monócitos) (LIBBY et al., 2010), ocasionando, o recrutamento dos monócitos para a lesão (RAO et al., 2007), aderindo-se firmemente às demais moléculas de adesão do endotélio e migrando para a camada íntima do vaso (CASÓS et al., 2008).

Esses monócitos diferenciam-se, então, em macrófagos, induzidos pelo fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), uma citocina/fator de crescimento produzido pelas células inflamadas da íntima (LIBBY, 2002; YAN; HANSSON et al., 2007), que então fagocitam as LDLs oxidadas por ligação aos receptores CD36 e SR-A, culminando na formação de células espumosas devido ao acúmulo de lipídeos nessas células (MANNING-TOBIN et al., 2009). As células espumosas são o principal componente das estrias gordurosas, que configuram as lesões macroscópicas iniciais da aterosclerose (CHOY et al., 2004; BADIMON et al., 2012). A ativação do macrófago também promove a liberação de citocinas como a IL-1, o TNF- α e fatores de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), quimiocinas, proteases e radicais de oxigênio, estimulando a replicação das células musculares lisas (INSULL, 2009), o que agrava o quadro de inflamação e dano ao tecido, contribuindo para o desenvolvimento da lesão (RADER; DAUGHERTY, 2008). Por fim, as células espumosas morrem, liberando fragmentos de celulares e colesterol cristalino, processo que contribui na formação de um núcleo necrótico no interior da placa

promovendo o recrutamento de células inflamatórias para o local (Figura 1) (MOTTA, 2013).

Além disso, uma vez oxidados, esses lipídeos insaturados da membrana celular pode modular diversas vias de sinalização levando a vários eventos celulares, tais como inativação de óxido nítrico (NO), modificações oxidativas de DNA e proteínas, aumento da proliferação e apoptose de células vasculares, e aumento da expressão e ativação de genes redox-sensíveis, como o receptor para LDLox, moléculas de adesão, fatores quimiotáticos, citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases de matriz (STEPHENS et al., 2009).

Dessa forma, confirmando o exposto por Libby (2002), o acúmulo de lipídios, células inflamatórias e elementos fibrosos que se depositam nas paredes arteriais são os responsáveis pela formação de placas ou estrias gordurosas, como observado acima. Assim, é notório, que as lipoproteínas, principalmente a de baixa densidade (LDL) tem ocupado papel de destaque na etiologia da doença aterosclerótica.

Vale salientar, que assim como nas LDLs, o principal componente lipídico de HDLs é o colesterol. No entanto, em contraste com o colesterol LDL, concentrações plasmáticas de colesterol HDL são inversamente associadas com doenças cardiovasculares e seus danos aos diferentes tecidos (et al., 2011). Esse fato pode ser explicado pela capacidade da do HDL em promover o efluxo de colesterol de macrófagos, bem como realizar o transporte do colesterol para o fígado, sendo este posteriormente excretado na bile e fezes (LINSEL-NITSCHKE; TALL, 2005). As HDLs têm várias outras propriedades que poderiam contribuir para a sua propriedade antiaterogênica, dentre elas, sabe-se que as HDLs têm efeitos antiinflamatórios igualmente in vitro e in vivo (BARTER et al., 2004), além de estimular a atividade da óxido nítrico sintase 3 (NOS3; também conhecida como eNOS) e assim aumentar a biodisponibilidade de óxido nítrico, um importante modulador do tônus vascular (MINEO et al., 2006).

Como as principais lipoproteínas associadas ao desenvolvimento da aterosclerose são LDL, mecanismo causador, e HDL, mecanismo protetor, o metabolismo dessas lipoproteínas é alvo das principais intervenções para prevenir e tratar as DCV e os danos secundários aos tecidos. (RADER; DAUGHERTY, 2008).

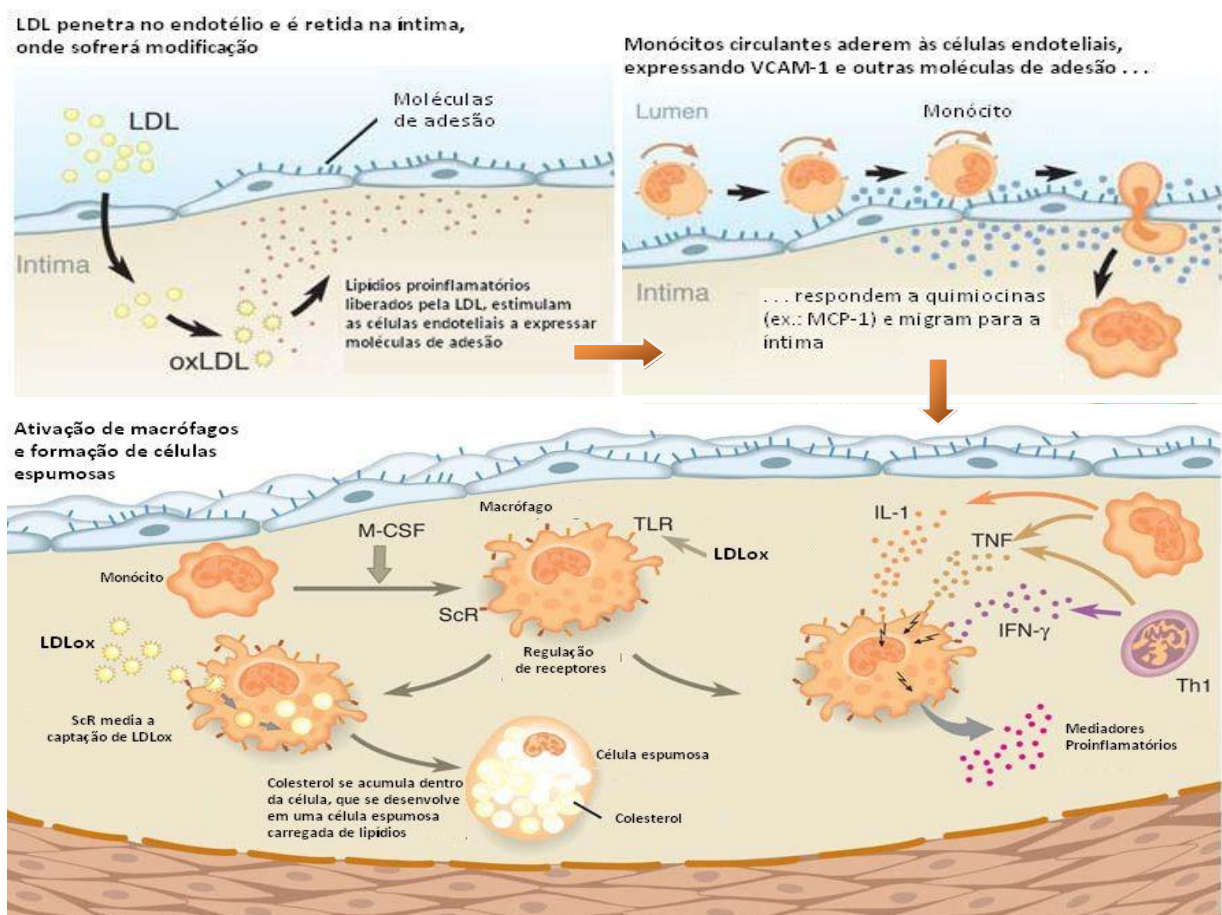


Figura 1: Oxidação do LDL (Fonte: Adaptado de Hansson; Robertson; Söderberg-Nauclér, 2006).

2.3 MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Alguns fatores de risco, como a hiperlipidemia, causam dano vascular e perda progressiva das funções protetoras do endotélio, aumentando, deste modo, o estresse oxidativo e a inflamação (TEIXEIRA, & LOPES, 2014). A quantificação da concentração sérica de marcadores inflamatórios é importante na avaliação do risco para eventos cardiovasculares agudos, assim, presume-se que a hiperlipidemia está acompanhada da elevação de marcadores inflamatórios séricos (SESMILO et al., 2001).

Alguns destes biomarcadores incluem: VCAM-1; citocinas tais como, fator de necrose tumoral (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-18 (IL-18); proteases como a metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9); Interleucina-6 (IL-6); produtos de plaquetas incluindo CD40 ligante solúvel (CD40L); adipocinas como a adiponectina e

reagentes de fase aguda tais como Proteína C Reativa (PCR), inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e fibrinogênio (PACKARD; LIBBY, 2008). Estes, em conjunto, desempenham papéis já bem estabelecidos no processo inflamatório como: expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia de células inflamatórias, diferenciação celular, produção de proteínas de fase aguda e a proliferação de células musculares lisas. Todos esses processos amplificam a resposta inflamatória local e sistêmica (LIBBY, 2002).

- **Proteína C reativa:**

A PCR é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado e regulada por citocinas, predominantemente a IL-6, o TNF- α e a IL-1 (ABDELLAOUI & AL-KHAFFAF, 2007). Seus níveis estão aumentados em resposta às infecções ativas ou ao processo inflamatório agudo. Elevações modestas dos níveis de PCR estão também presentes em situações crônicas inflamatórias, como a aterosclerose e seus níveis aproximadamente triplicam na presença de risco de doenças vasculares periféricas (FRANCISCO et al., 2006). Dessa forma, tem sido descrito pela literatura a capacidade de a PCR prever eventos cardiovasculares (DUNCAN & SCHMIDT, et al, 2001).

O aumento sérico da PCR pode estar associado ao processo inflamatório por vários mecanismos: a) inibe a transcrição do óxido-nítrico-sintetase endotelial (eONS) nas células endoteliais e desestabiliza o RNAm da eONS, o qual leva a um decréscimo na liberação basal de ON; b) promove a expressão de moléculas de adesão (CAMs) pelas células endoteliais, induz a MCP-1 e promove a captação de colesterol pelos macrófagos; c) estimula os monócitos a produzir o fator tissular e citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) por meio da estimulação do fator de transcrição nuclear kappa- β (DARVAL et al., 2007; DANDONA et al., 2007).

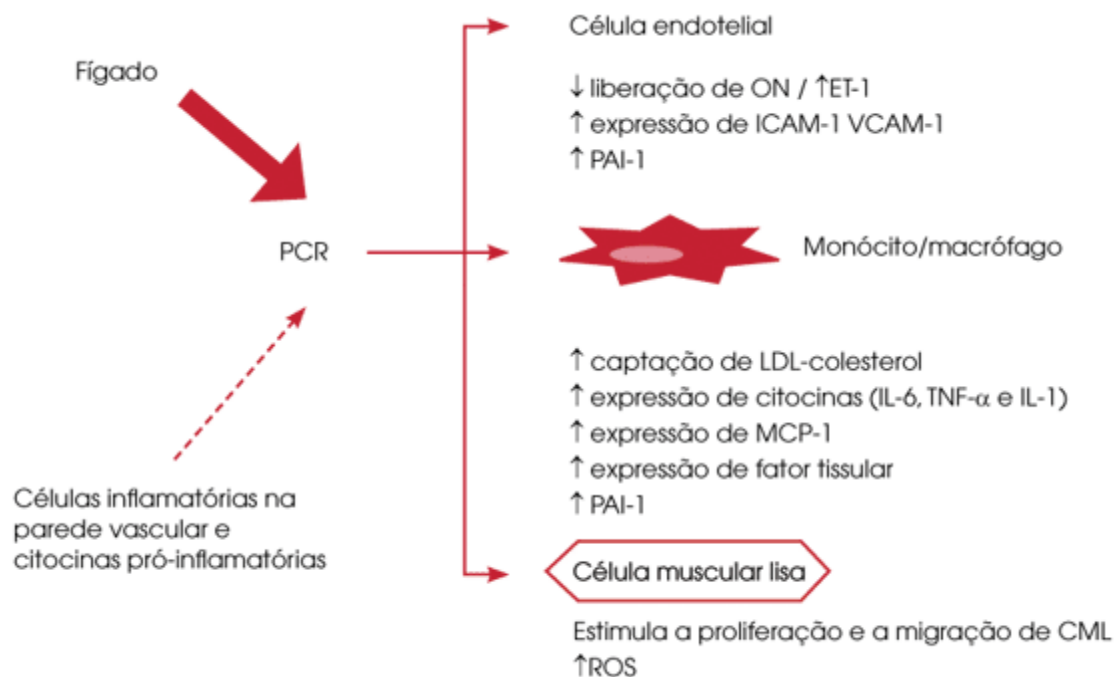


Figura 2: PCR e inflamação (Fonte: Adaptado de Francisco et al., 2006).

Entre todos os marcadores inflamatórios, a PCR é a única que sozinha apresenta mais força em predizer risco para doenças. Porém, algumas limitações devem ser levadas em consideração, pois seus níveis séricos podem elevar-se transitoriamente por duas a três semanas depois de uma grande infecção, trauma ou evento isquêmico agudo (HUNG et al., 2005).

- **IL-6:**

A IL-6 é produzida e secretada por células endoteliais, células musculares lisas, monócitos e macrófagos e pode contribuir para processo inflamatório pelo seu efeito parácrino, autócrino e endócrino (SOUZA et al., 2008). É uma citocina pleiotrópica que desempenha uma gama de funções nos efeitos imunes celulares e humorais relacionados à inflamação, defesa do hospedeiro e injúria tecidual (FRANCISCO et al., 2006). Esta citocina é mediadora central da resposta de fase aguda e a principal citocina pró-coagulante, pois determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas estimuladas pelo fígado de fibrinogênio, proteína amiloide sérica A (SAA), e em especial, da proteína C reativa (PCR) (WILLERSON & RIDKER, 2004). A IL-6 é amplamente expressa durante uma reação inflamatória, produzindo efeitos indesejáveis em vários órgãos (TONET et al., 2008), esta normalmente, é expressa em níveis baixos, exceto durante infecção, trauma ou outros fatores estressantes.

Uma vez que está envolvida em uma série de atividades imunológicas, em especial a síntese de substâncias de fase aguda pelo fígado, a IL-6 é um importante marcador inflamatório (RAMOS et al., 2009). (Figura 3).

- **TNF- α**

É uma citocina com ação autócrina, parácrina e endócrina. Age no adipócito, desempenhando um papel regulador no acúmulo de gordura corporal, pela inibição da lipogênese, com diminuição da expressão do GLUT-4 e da acetil-CoA sintetase, bem como com aumento da lipólise (RUAN & LODISH, 2003). Por causa de sua atividade biológica pleiotrópica, esta citocina está envolvida no processo de inflamação, pois desempenha um papel principal na cascata das citocinas e estimula a síntese de outras citocinas (FERNANDEZ & SIMO, 2006). Assim como a IL-6, o TNF- α é mediador central da resposta de fase aguda, pois também determina a produção e a elevação das concentrações plasmáticas estimuladas pelo fígado de fibrinogênio, SAA, inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) e, em especial, da PCR (WILLERSON & RIDKER, 2004). O TNF α está relacionado com o aumento dos níveis de LDL oxidado em placas ateroscleróticas e como a sua instabilização, causando degradação da matriz colagenosa ao aumentar a indução de metaloproteinases de matriz (FRANCISCO et al., 2006)

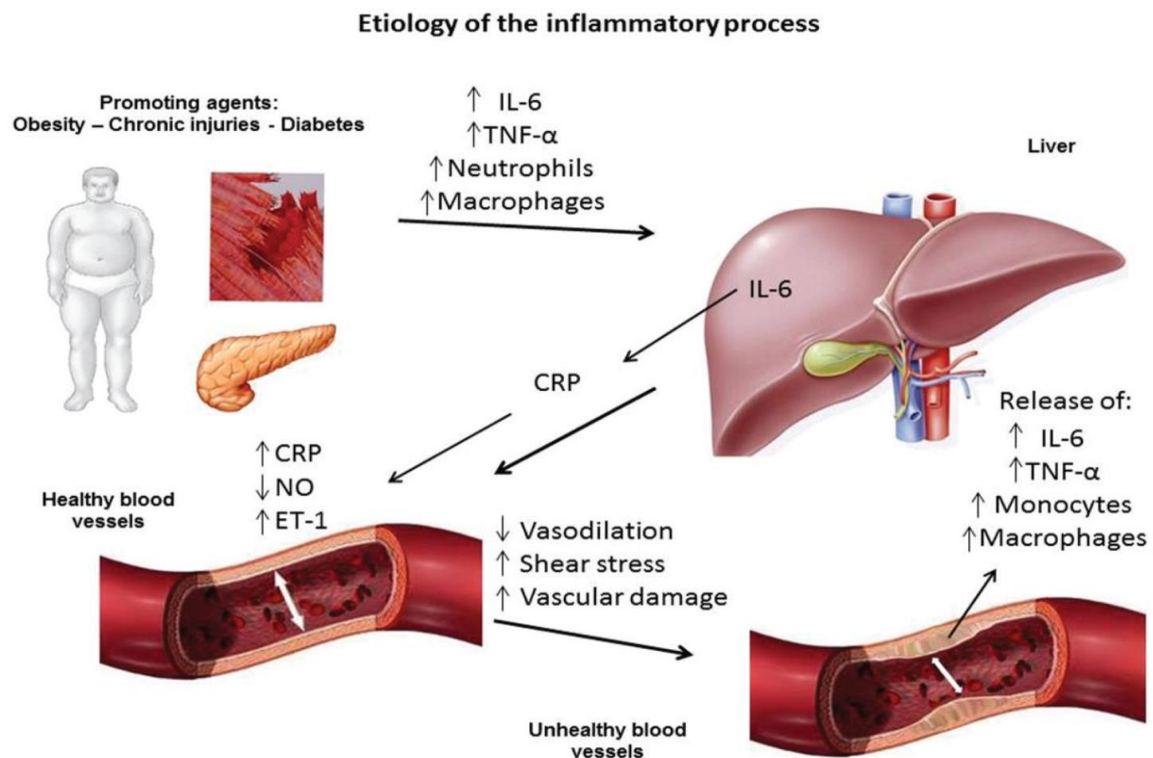


Figura 3: Etiologia do processo inflamatório (Fonte: PACKARD; LIBBY, 2008).

• Metaloproteinases (MMP):

As MMP constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais, pertencem a uma família de enzimas que necessitam da presença do zinco para realizarem suas funções (WOESSNER, 2008). Apresentam diversas classes, dentre elas, as gelatinases. As gelatinases A e B (MMP-2 e -9) degradam principalmente colágeno desnaturado (gelatinas) e colágeno tipo IV (HIDALGO, 2001).

As principais células que produzem MMPs são os leucócitos polimorfonucleares, os queratinócitos, os monócitos, os macrófagos, os fibroblastos e as células mesenquimais. Essas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo a Interleucina 1 (IL-1), a TNF-α e a TGF-α. Na presença desses fatores de crescimento e citocinas, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular (BIRKEDAL-HANSEN, 2013).

A atividade das MMPs é controlada também por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam ambas as funções das MMPs, o nível de sua

ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato (SOUZA, 2002). O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular. É conhecido que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos (COTRIM et al., 2002). Por essa razão, há um grande interesse em desenvolver inibidores sintéticos das MMPs que possam ser usados em terapias médicas (TONET et al., 2008).

As MMP estão atuam maximizando os efeitos da inflamação, levando ao maior recrutamento de células inflamatórias, migração de células musculares lisas e ao intumescimento do ateroma e consequente instabilidade da placa (CHARRIERHISAMUDDIN et al., 2008, HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008). Assim, são biomarcadores que estão intimamente relacionados direta ou indiretamente à modificação/remodelamento da parede vascular e outros tecidos (OLIVEIRA e SILVA, 2002; BORGES, 2006; LIMA e COUTO, 2006; COUTO et al., 2007, CORRÊA, 2009).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre moléculas oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs), e a defesa do sistema antioxidante do organismo (GOETZ; LUCH, 2008; STEPHENS et al., 2009; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013), tornando a parede celular susceptível aos danos, provocados por mecanismos envolvidos na aterogênese, como a ativação de diversas vias de sinalização celular e fatores de transcrição redox-sensíveis, os quais potencializam a susceptibilidade da placa à ruptura (SINGH; JIALAL, 2006; VOGIATZI; TOUSOULIS; STEFANADIS, 2009).

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados a processos fisiológicos e com a etiologia de várias doenças, como envelhecimento, e doenças crônicas, tais como diabetes, câncer e aterosclerose, onde frequentemente se observa o aumento do conteúdo das EROs mais importantes no contexto biológico (ROSEN et al., 2001; HIGASHI et al., 2014).

2.4.1 Espécies reativas de oxigênio

A produção de ERO constitui uma característica intrínseca ao metabolismo aeróbico e pode ser deletéria aos organismos (GRIENDLING et al. 2016). As ERO, que podem ser radicais livres ou não (como os peróxidos), são espécies de oxigênio que estão em um estado mais reativo que o oxigênio molecular (MONAGHAN et al., 2009). As ERO, que incluem radicais livres, são continuamente produzidas no corpo a partir de inúmeras reações no organismo, exercendo, por exemplo, papel fundamental na homeostase e função vascular, por influenciar na proliferação, apoptose e sobrevivência das células endoteliais lisas (HIGASHI, et al, 2014), fazendo parte do metabolismo normal celular (MADAMANCHI et al., 2005), tendo, portanto, importante papel fisiológico em baixas concentrações. Porém, condições patológicas como a inflamação e fatores exógenos, como o cigarro, poluentes do ar, radiação, medicamentos e dieta podem aumentar a produção das espécies reativas (CUTLER, 2005), como os superóxidos, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila.

O ânion superóxido constitui a ERO primária, pois é formado em sistemas biológicos pela primeira redução do oxigênio molecular, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase (GENESTRA, 2007), agindo como um radical livre fraco, este pode atuar reduzindo alguns materiais biológicos, como o citocromo c, e oxidar outros, como o ascorbato (GOETZ; LUCH, 2008).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é um composto reativo que exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila em circunstâncias específicas. Este composto apesar de ser citotóxico, é considerado um agente oxidante relativamente fraco (POWERS; JACKSON, 2008).

Por outro lado, o radical $OH\cdot$ é altamente reativo, apresentando caráter deletério a célula, por provocar danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (BARREIROS; DAVID, 2006). Postula-se que o radical $OH\cdot$ contribua para vários processos fisiopatológicos, como envelhecimento, câncer, diabetes, síndrome de isquemia e reperfusão (GOETZ; LUCH, 2008; POWERS; JACKSON, 2008).

Uma vez presentes em altas concentrações, estes oxidantes podem provocar danos em estruturas celulares, como os ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (STEPHENS et al., 2009), além de modificar a estrutura e função das proteínas

celulares responsáveis pela sinalização celular e expressão gênica (BARFORD., 2004), tendo em vista, que estes produtos podem ter efeitos deletérios sobre a função vascular por basicamente três mecanismos: 1. os radicais hidroxila podem causar dano direto nas membranas e núcleo celular; 2. As EROs podem interagir com mediadores vasoativos endógenos nas células endoteliais, modulando a vasomotricidade; 3. Podem favorecer a peroxidação de componentes lipídicos, levando à formação de LDLox, um dos mediadores chaves da aterosclerose (BONOMINI et al., 2008). (figura 2).



Figura 4: Efeitos celulares dos ânions superóxidos e seus derivados (Fonte: Afonso et al, 2007).

2.4.2 Sistema de defesa antioxidante

Para minimizar os danos causados pela ação das ERO e, conseqüentemente, pelo estresse oxidativo, um sistema antioxidante bem organizado trabalha de forma coordenada. Dessa forma, a ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas (MUHAMMAD et al., 2014) O termo antioxidante é amplamente definido como qualquer substância que retarda ou evita a oxidação de um substrato. Quando este é suficiente em balancear o ataque das ERO, o organismo reduz o estresse oxidativo (MONAGHAN et al., 2009).

O organismo humano apresenta mecanismos de defesa antioxidante, que atuam dentro e fora da célula para manter o equilíbrio redox, atuando como uma unidade complexa na regulação das ERO (POWERS; JACKSON, 2008), assegurando que o aumento das EROs seja transitório. Existem dois mecanismos antioxidantes: o enzimático e o não enzimático, os quais interagem entre si para manter o equilíbrio dos radicais livres no organismo (ROSSI et al., 2014). As proteções conhecidas do organismo contra as ERO abrangem a proteção enzimática ou por micromoléculas, que podem ter origem no próprio organismo ou são adquiridas através da dieta (BOSE et al, 2012).

O sistema de defesa enzimático é a primeira linha de defesa do organismo contra danos oxidativos. O sistema enzimático inclui diversas enzimas, tais como superóxido desmutase (SOD), catalase, glutathione redutase e glutathione peroxidase e outras redutases (SHAFIEI et al., 2015). Já o mecanismo não enzimático é constituído por um grande número de compostos de baixo peso molecular, ingeridos pela dieta (nutrientes e não nutrientes) ou sintetizados no organismo, como as vitaminas A, C e E, o peptídeo glutathione e os flavonóides (SINGH; JIALAL, 2006; RIBEIRO et al., 2008).

O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido desmutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathione peroxidase (GPx) (ZOUAR et al., 2016)

A enzima superóxido desmutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), transformando-os em H_2O_2 e oxigênio (reação de dismutação) (BRITO et al, 2013). A SOD se distribui predominantemente no citoplasma, mas pode ser encontrada no núcleo e espaço entre as membranas das mitocôndrias (VALENTINE et al., 2005), sendo encontrada em abundância, perfazendo em alguns tecidos aproximadamente cerca de 0,5% da proteína total (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 2007). Níveis elevados desta enzima relacionam-se com aumento da função endotelial em condições de hipercolesterolemia e prevenção da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrentes de hiperglicemia (FARACI; DIDON, 2004) sendo importante, portanto na prevenção e tratamento da doença aterosclerótica.

Por outro lado, a glutathione peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxidos de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos para água e álcool, na mitocôndria. A redução do H_2O_2 , ocorre pela conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada

(GSSH), que é catalisada pela GPx (TRACHOOTHAM et al., 2008). Baixas concentrações de GPx levam a detoxificação ineficiente dos peróxidos lipídicos e de hidrogênio, podendo favorecer a formação de radicais peroxila e hidroxila, respectivamente (WASSMANN et al., 2004), fato que contribui para aterogênese.

A catalase (CAT), assim com a GPX é uma enzima antioxidante intracelular localizada nos peroxissomos, que catalisa a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular. Ao remover peróxidos de hidrogênio, a catalase age indiretamente contra os radicais superóxido, que são convertidos em peróxido de hidrogênio pela SOD (STEPHENS et al., 2009). Possui um importante papel na proteção dos organismos quando o mesmo encontra-se sob elevado estresse oxidativo, protegendo as células do H₂O₂ produzido em seu interior, desempenhando um papel significativo no desenvolvimento de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa das células (WASSMANN et al., 2004; POWERS; JACKSON, 2008; STEPHENS et al., 2009).

Entretanto, tais mecanismos de defesa citados acima contra as EROS no organismo podem ser insuficientes e os danos causados podem ser tornar cumulativos, resultando em um estresse oxidativo. Por isso, é de fundamental importância, a suplementação alimentar com antioxidantes que ampliem a sua capacidade de inativa ou reduzir a produção destas espécies instáveis (CIOFU & LYKKESFELDT, J, 2014).

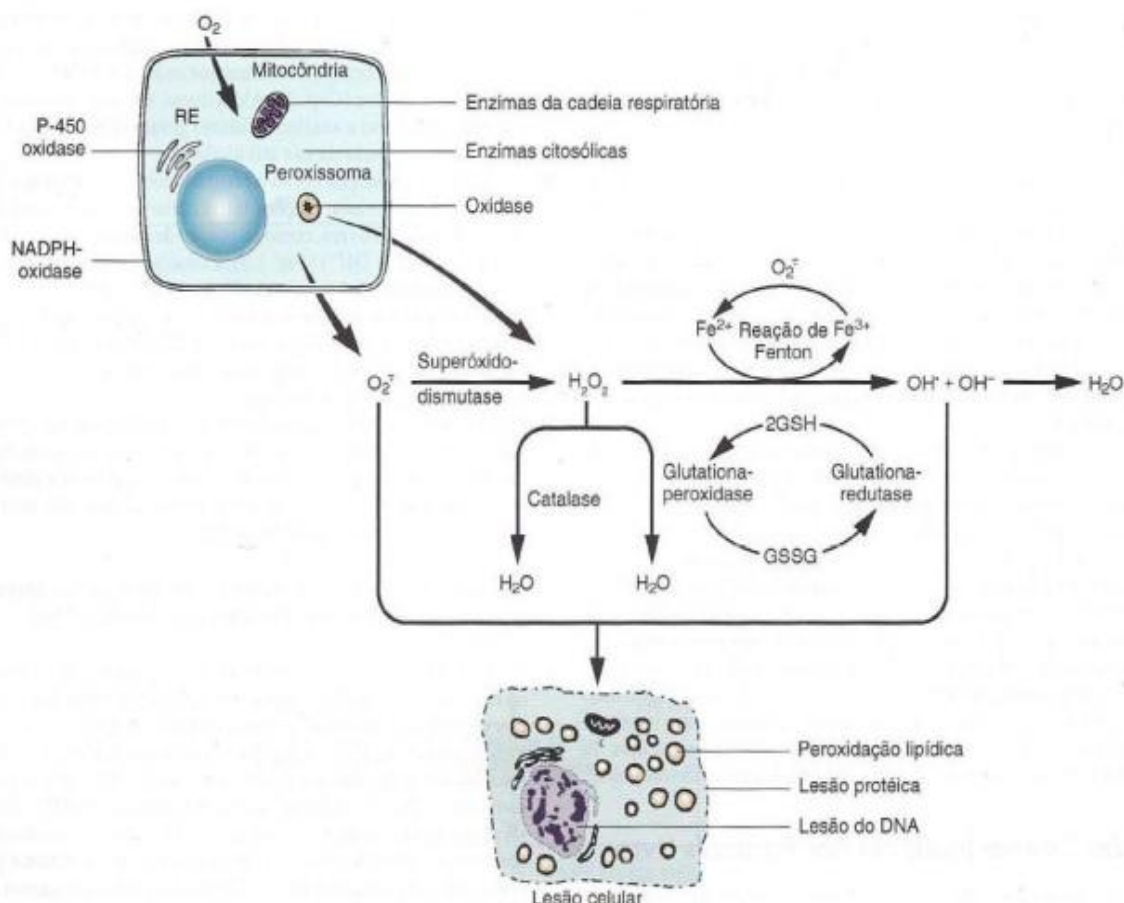


Figura 5: Sistema de defesa antioxidante enzimática. (Fonte: CIOFU, O.; LYKKESFELDT, J, 2014).

Alguns nutrientes essenciais podem atacar diretamente os radicais de oxigênio, sendo, portanto, antioxidantes de origem dietética, constituindo o sistema de defesa não enzimático (KOLOMVOTSOU et al, 2013). Como exemplo, podemos citar: as vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A, carotenoides são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (KIM et al, 2015). Existe, ainda, uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que participam da defesa contra as espécies reativas do oxigênio nos sistemas biológicos como, por exemplo, a ubiquinona, a ceruloplasmina, o ácido úrico, a taurina, os flavonóides e outros compostos fenólicos de origem vegetal. Além destes, há vários nutrientes essenciais de origem mineral, que participam do processo antioxidante em associação com enzimas. São eles, zinco, cobre, manganês, selênio e ferro (MONTERO et al., 2014).

2.5 MODELO EXPERIMENTAL DA HIPERLIPIDEMIA

Com a finalidade de buscar opções para tratamento das hiperlipidemias, modelos de indução em estudos pré-clínicos tem sido utilizados para testar substâncias para essa finalidade (OULMOUSEN et al., 2011), com isso, estudos dietéticos, metabólicos e toxicológicos são extensivamente realizados na tentativa de elucidar os fatores de risco para hiperlipidemia e suas consequências patológicas, tais como, lesões no sistema cardiovascular, disfunção renal, fibrose hepática, entre outros (LEVINE; SALTZMAN, 2007).

Em estudos experimentais, a hipercolesterolemia é geralmente induzida por dietas e/ou manipulações genéticas, contudo também pode ser obtida através da utilização de alguns detergentes sintéticos como forma de uma resposta tóxica (LEVINE & SALTZMAN, 2008). A hiperlipidemia pode ser percebida em apenas uma semana após a exposição a uma dieta hipercolesterolêmica ou fármacos hiperlipemiantes. De acordo com Perez (1999) e Bartus (2005), as vantagens da indução das dislipidemias experimentais por detergentes sintéticos estão relacionados a elevação do perfil lipídico em curto espaço de tempo, adequado controle dietético associado a fatores ambientais, a possibilidade de estudos sobre a reversibilidade de lesões ateroscleróticas e ensaios pré-clínicos de substâncias hipolipidêmicas.

Dessa forma, o surfactante Triton WR 1339, também conhecido como tyloxapol, um detergente não ionico, vem sendo empregado para a indução da hiperlipidemia aguda, com a finalidade de avaliar a atividade de substâncias na redução dos níveis de lipídios plasmáticos (KUMAR et al., 2012; KUMAR et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2013).

2.5.1 Triton WR 1339 – Tyloxapol

Os surfactantes são definidos como moléculas capazes de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas e compreendem uma importante classe dentro da indústria farmacêutica e cosmetológica. Eles são à base dos detergentes, além de serem fundamentais para a composição de emulsões, microesferas, suspensões e aerossóis (REBELLO et al., 2002). Inicialmente seu uso era restrito à síndrome respiratória, porém em anos mais recentes a pesquisa no campo da terapêutica com

surfactante exógeno abrange outras funções (REBELLO et al., 2002). Dentro os surfactantes mais conhecidos, destaca-se o tyloxapol.

Tyloxapol é um surfactante, detergente não iônico, que atua inibindo a lipase lipoproteica (LPL), induzindo assim, o aumento do colesterol e triacilgliceróis séricos (CASTRO, ARTONI, PACHECO, 2012), além de favorecer o aumento da atividade da enzima hidroximetilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA) (ABE et al, 2007), que é a enzima-chave intracelular para síntese do colesterol hepático. Tem sido amplamente utilizado para bloquear a depuração das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e, assim, induzir a hiperlipidemia aguda em diversos animais (IYER, SHARMA, PATIL, 2013).

Em trabalhos realizados por Kumar et al. (2013) e Mishra et al. (2013), utilizando doses de 400 mg/Kg de tyloxapol em ratos machos por setes dias e dez dias, respectivamente, observou que o mesmo foi capaz de induzir uma hiperlipidemia, pois foi capaz de provocar um aumento significativo nos níveis plasmáticos de colesterol total e triglicérides quando comparado com o grupo controle negativo. Já Harisa et al. (2017), relata que a administração intraperitoneal do surfactante na dose de 300 mg/kg de peso corporal em ratos foi eficaz na indução da hipercolesterolemia observando-se um aumento de 108% nos níveis de triacilgliceróis. Outro estudo por Levine; Saltzman (2007) utilizando uma única injeção do surfactante na dose de 500 mg/kg de massa corpórea pela via intravenosa causou lipemia com níveis séricos elevados de colesterol, triacilgliceróis e HDL em ratos necropsiados um ou dois dias após a aplicação.

Segundo Levine & Saltzman (2007), as elevações dos níveis de colesterol e triglicérides utilizando-se o surfactante como agente indutor são muito mais acentuadas comparadas às obtidas quando da utilização de dietas suplementadas com óleos ou colesterol, porém, são necessárias mais do que duas aplicações de surfactante por semana, pela via intravenosa ou intraperitoneal, para indução da hiperlipidemia. Concordando com estudo realizado por Bertges et al. (2011), que ao estudar a qualidade e a durabilidade do estado hipercolesterolêmico induzido pelo tyloxapol na dose de 200 mg/kg, conclui que esta substância foi bastante efetiva na indução de hipercolesterolemia com pico em 72 horas após a administração, contudo, após esse período, houve queda dos níveis de colesterol para valores comparáveis aos basais.

Com isso, a obtenção de níveis elevados de colesterol e triglicérides de forma contínua pode ser especialmente importante em estudos histopatológicos para avaliação de depósito de placas de ateromas. Contudo, se houver intervalos de tempo com níveis lipídicos normais, a regeneração ou regressão das lesões ateromatosas serão permissíveis (LEVINE; SALTZMAN, 2007).

2.6 TRATAMENTO DA HIPERLIPIDEMIA

As patologias relacionadas com a hiperlipidemia têm levado a uma busca incessante por dietas com baixo teor lipídico e medicamentos que favoreçam a redução lipídica são estratégias para prevenção ou tratamento das DCV (CHANDLER et al., 2003; HARNABI et al., 2007). Diante desse cenário, ocorre também uma busca incessante por novos fármacos que promovam a diminuição ou prevenção dos danos causados por problemas genéticos ou por aqueles relacionados com níveis altos de lipídeos resultantes do consumo excessivo de dieta rica em gordura (OLIVEIRA et al., 2002b). Dentre as classes de medicamentos com ação hipolipemiante, os mais utilizados são as estatinas e os fibratos (RIDEOUT et al., 2014).

2.6.1 Estatinas

As estatinas são metabólitos de fungos (MANO, 2015), que apresentam uma ação hipolipemiante por atuar primariamente no fígado inibindo a ação da enzima 3-hidroxiacetilglutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), através de uma afinidade destes fármacos com o sítio ativo da enzima. Ao inibir a enzima HMG-CoA, impede a conversão do substrato do HMG-CoA em ácido mevalônico, diminuindo, desse modo, a síntese de colesterol. (Figura 4). Esta inibição enzimática reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, removem mais VLDL, IDL e LDL da circulação para repor o colesterol intracelular (DAVIDSON; TOTH, 2004), além de ser uma inibição reversível e competitiva com o substrato HMG-CoA (SANTOS, 2013).

De tal forma que a redução do colesterol provocada pelas estatinas contribui para a estabilização da placa aterosclerótica, reduzindo o tamanho desta e modificando as propriedades físicas e químicas do centro lipídico (FOODY et al., 2006). Apesar da forte interação da estatina com o sítio ativo da enzima, a utilização de doses

progressivamente mais elevadas desse tipo de fármaco não parece aumentar significativamente sua capacidade de reduzir a LDL colesterol (LDL-C) (GRUNDY et al., 2004). Vale ressaltar que além de promover uma redução na síntese de colesterol, as estatinas inibem também a oxidação de LDL independentemente dos níveis de lipídios (MASON, 2003). Esta inibição é demonstrada pelo aumento da enzima antioxidante catalase na aorta, bem como pela redução da expressão das subunidades p22phox e nox1 da NADPH oxidase em ratos, após a administração da estatina atorvastatina (LIAO, 2009).

Além de promover benefícios relacionados ao metabolismo lipídico na aterosclerose, as estatinas apresenta efeito modelador da ação imunológica, exercendo efeitos anti-inflamatórios na parede vascular e diminuindo o número de células inflamatórias na aterosclerose (BASSON, 2000). Segundo Nordoy et al. (2001), este mecanismo anti-inflamatório resulta da capacidade das estatinas em diminuir a expressão de moléculas de adesão endotelial como a ICAM-1, a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e a Eselectina. Além disso, ensaios clínicos demonstraram que as estatinas atenuam a expressão da P-selectina e a adesão de leucócitos em animais normocolesterolêmicos através do aumento da sintetase de óxido nítrico das células endoteliais (HOFFMEYER et al., 2001).

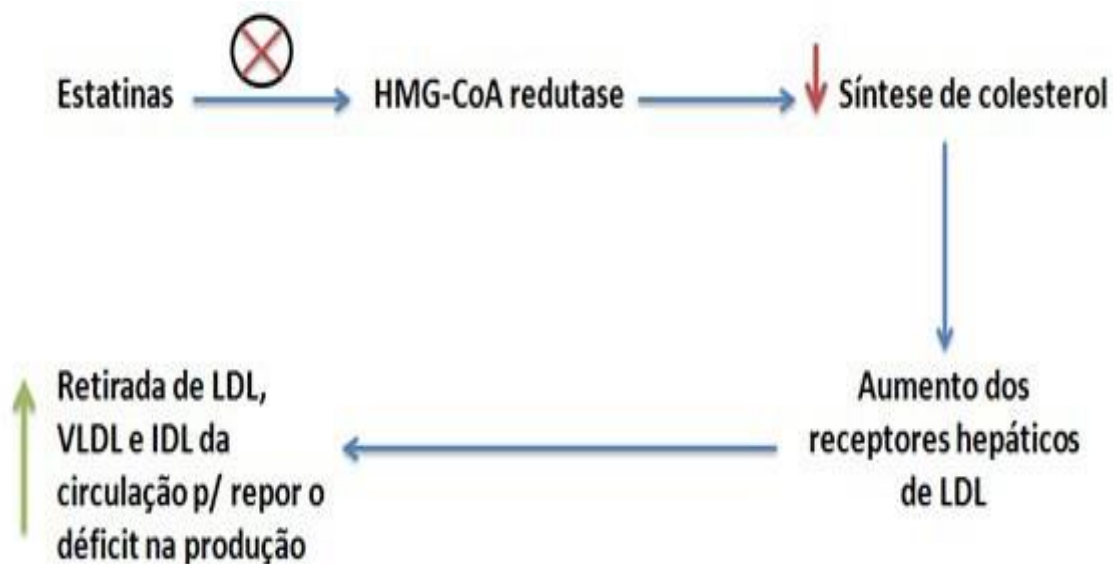


Figura 6: Efeito das estatinas na biossíntese do colesterol (Fonte: Loecker; Preise, 2012).

Outro mecanismo pelo qual as estatinas interferem no processo hiperlipidêmico é através da redução da acumulação de macrófagos nas lesões arterioscleróticas (AIKAWA et al., 2001). Além disso, as estatinas atuam inibindo a produção das metaloproteinases da matriz (MMP) e de fator tecidual (TF) pelos macrófagos (HARAMAKI et al., 2007). As estatinas inibem a expressão de MMP e de TF através de mecanismos dependentes e independentes do colesterol. Os mecanismos independentes do colesterol são mediados por uma redução conjunta de lipídios, macrófagos e MMP (BOURCIER; LIBBY, 2000).

Segundo Liao; Zhou (2009), as estatinas apresentam outros benefícios clínicos independentes da diminuição do colesterol. Estes efeitos independentes do colesterol, também chamados de efeitos pleiotrópicos, são responsáveis pelos resultados favoráveis que se têm verificado com o uso das estatinas na DCV (FALAGAS, 2008). Os efeitos pleiotrópicos das estatinas na DCV incluem a diminuição da inflamação vascular, melhoria da função das células endoteliais, diminuição da proliferação e migração das células musculares lisas vasculares, atenuação da remodelagem vascular e miocárdica, inibição da agregação plaquetar e estabilização da placa aterosclerótica (LAUFS; LIAO, 2005).

No Brasil, cinco estatinas são comercializadas, são elas: sinvastatina, lovastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rosuvastatina (HARAMAKI et al., 2007).

2.6.2 Sinvastatina

A sinvastatina, através do seu metabólito ativo, o beta-hidroxiácido, inibe especifica e competitivamente a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA em mevalonato, que é uma passagem precoce e limitante na biossíntese do colesterol. Dessa forma, a sinvastatina aumenta moderadamente o HDL e reduz o LDL o VLDL, o colesterol plasmático total, e os triglicerídeos plasmáticos (BING et al., 2016). Além disso, a sinvastatina apresenta atividade antiaterogênica relacionada à melhora da disfunção endotelial e vasomotora, diminuição da formação de trombos plaquetários e modulação na atividade fibrinolítica em pacientes hipercolesterolêmicos (YANG et al., 2016).

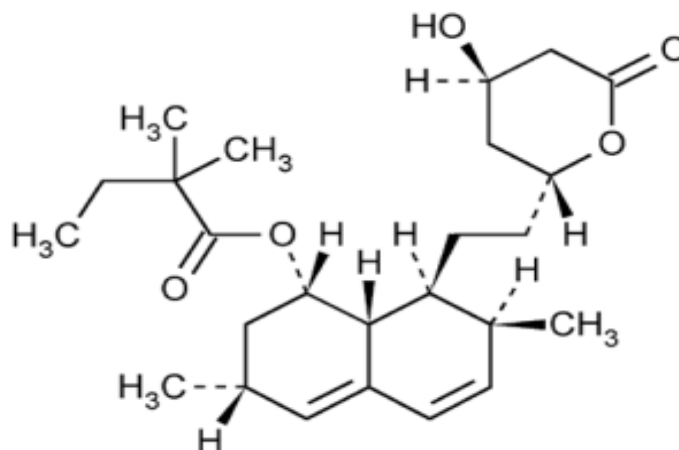


Figura 7: Fórmula estrutural da sinvastatina (Fonte: USP, 2008).

Esta estatina é um dos fármacos mais prescritos para prevenir as doenças cardiovasculares, principal causa de morte no mundo (SCHMIDT et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Este fármaco, é frequentemente aviado nas farmácias magistrais sob a forma de cápsulas, foi o medicamento mais dispensado em 2010 nas farmácias do programa Farmácia Popular do Brasil em Belo Horizonte (SOUZA, 2010), além de integrar a lista RENAME/SUS por apresentar a melhor relação custo-efetividade no tratamento das hiperlipidemia e na profilaxia secundária da doença coronariana (ARAÚJO et al., 2011). Este fármaco apresenta um intenso efeito de primeira passagem (50 a 80%), logo, a concentração do fármaco na circulação sistêmica é baixa, apresentando-se como uma vantagem, já que o fígado é o órgão alvo, reduzindo ainda os possíveis efeitos sistêmicos (RAMOS et al, 2011).

No Brasil, é comercializada sob as formas farmacêuticas de comprimidos e comprimidos revestidos em doses que variam de 5mg a 80 mg por comprimido (DEF 2010/2011). A sinvastatina é praticamente insolúvel em água, sendo, portanto solúvel em álcool, clorofórmio e álcool metílico. É importante salientar que esta sofre oxidação e deve ser estocada em atmosfera de nitrogênio, dessa forma, os comprimidos devem ser armazenados em recipientes herméticos e à temperatura entre 5 e 30° C (USP, 2008).

Num ensaio clínico, após administração durante uma semana de 40mg de sinvastatina em indivíduos com doença coronária verificou-se um aumento de 1,5 vezes das células endoteliais progenitoras. Concordando com estudos de

Landmesser; Bahlmann, (2005), que verificou que em pacientes com insuficiência cardíaca crônica (ICC), o tratamento com sinvastatina por quatro semanas, melhorou a função endotelial e reduziu o estresse oxidativo. Um estudo demonstrou ainda que a sinvastatina, através de um processo dependente NO, preserva o potencial de membrana mitocondrial nos miócitos cardíacos em situações de stress oxidativo.

Outro importante efeito da sinvastatina é seu poder no processo inflamatório, pois apresenta a capacidade de reduzir as concentrações de proteína C reativa (PCRs) circulante em pacientes hipercolesterolêmicos (RIFAI; RIDKER, 2001). Somado a isto, a sinvastatina ainda diminui a expressão de IL-6, IL-8 e NFkB em células epiteliais (SAKODA, YAMAMOTO et al., 2006). Adicionalmente, Kagami et al. (2008) demonstraram que a sinvastatina diminui a expressão de RNAm de TNF α e IL-6 em mastócitos de murino, já Li et al (2015) demonstrou que a sinvastatina atenua o processo inflamatório mediante a redução da IL-1 β em células da microglia de ratos Wistar após injúria do cérebro, além de diminuir a secreção de MCP-1 e MMPs em camundongos deficientes do gene da Apolipoproteína E (APOE) (ZHANG et al., 2009).

Diante do exposto, é bem documentado na literatura que a sinvastatina atua como uma droga hipolipemiante, além de desempenhar um papel eficiente no perfil inflamatório. Porém, levando-se em consideração, que os lipídios quando são oxidados provoca uma cascata inflamatória, ocasionando complicações teciduais, foi proposto que uma importante opção terapêutica na prevenção das complicações cardiovasculares são os antioxidantes, que atuariam neutralizando os radicais livres e aumentando a defesa antioxidante do organismo. Entre os antioxidantes, encontramos a melatonina.

2.7 MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um neuro-hormônio pertencente ao grupo das indolaminas, secretada principalmente pela glândula pineal, além da retina, trato gastrointestinal, fígado, testículos e ovários (HARDELAND et al., 2011). Essas fontes extrapineal contribuem minimamente para a concentração plasmática da melatonina, porém, apresentam importância considerável para ação parácrina e/ou autócrina desse hormônio (PONTES et al., 2006). É uma molécula altamente conservada evolutivamente, apresentando funções decorrentes de sua produção

noturna em todos os grupos de seres vivos, desde organismos unicelulares até o homem (TAMURA, 2009).

2.7.1 Síntese e mecanismo de ação da Melatonina

A MEL é sintetizada pelos pinealócitos a partir do neurotransmissor serotonina (MAGANHIN et al., 2008) sua síntese se inicia com a captação do aminoácido triptofano que é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofanhidroxilase (TH). Por sua vez, o 5-HTP é metabolizado em serotonina (5-HT), após sofrer a remoção do grupo alfa-carboxil terminal pela enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD). Em seguida, a N- acetiltransferase (NAT) catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em melatonina (Figura 6) (MARONDE et al., 2011).

O pico da secreção de MEL é atingido no período noturno (HIRIART, 2012), devido que a enzima HIOMT só pode ser fabricada na ausência de luz, fazendo assim que a MEL seja considerada um agente endócrino da escuridão (ZIELIŃSKA et al., 2016).

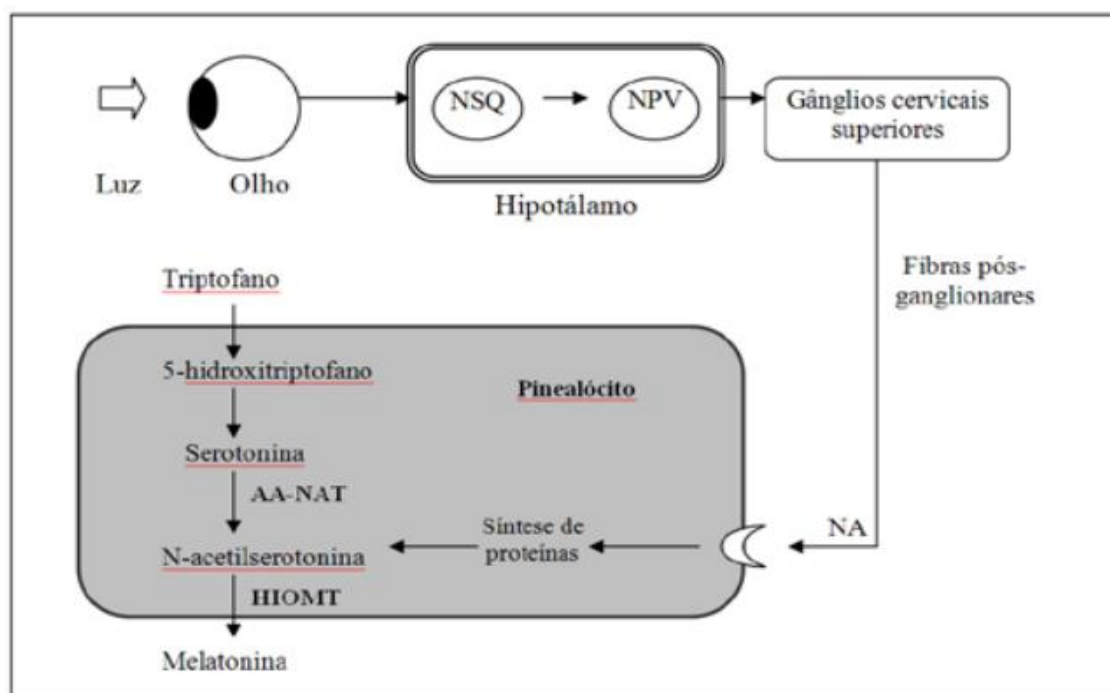


Figura 8: Biossíntese da melatonina (Modificado de Maronde et al., 2011).

Uma vez formada, a MEL não é armazenada na glândula pineal, ela se difunde livremente através de todas as membranas biológicas agindo praticamente em todas as células do organismo (SRINIVASAN et al, 2013). Algumas ações são mediadas por receptores melatonérgicos de membrana tipos 1 e 2 (MT1 e MT2) acoplados à proteína G, enquanto outras são independentes, como a ligação a receptores hormonais nucleares associados à diferenciação celular e regulação de resposta imune (DUBOCOVICH; MARKOWSKA, 2005).

Segundo Hardeland (2009), em mamíferos os receptores de membrana denominados MT1 e MT2 (originalmente descritos como Mel1a e Mel1b, respectivamente) são expressos tanto individualmente como em conjunto em vários tecidos e órgãos. O subtipo MT1 é expressando no rim, fígado, vasos, pele e órgãos reprodutivos. Já a expressão do subtipo MT2 é mais restrita, sendo encontrado principalmente no cérebro (com exceção dos NSQs), embora a sua presença também tenha sido detectada das células do sistema imunológico, duodeno, pulmão e adipócitos (PANDI-PERUMAL et al., 2008). Apesar da existência desses dois tipos de receptores, estes apresentam diferentes afinidades para a melatonina, de forma que a afinidade para o MT1 é cerca de três vezes maior em relação ao MT2 (WITTENDERBY et al., 2003).

Em acréscimo, um terceiro tipo de receptor de membrana (MT3) chegou a ser designado, mas, posteriormente, foi demonstrado que se tratava de uma enzima citosólica denominada quinona redutase 2 (QR2) (NOSJEAN et al., 2000). Esta enzima pertence ao grupo de redutases que participa da proteção contra o estresse oxidativo (PANDI-PERUMAL et al., 2008), além de regular a adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (VINCENT et al., 2010).

2.7.2 Funções da melatonina

Por apresentar receptores amplamente distribuídos pelo corpo (HARDELAND, 2009), a MEL pode ser responsável por uma série de eventos fisiológicos. Em mamíferos, as funções fisiológicas da melatonina estão relacionadas à regulação do relógio circadiano, funções cardiovasculares, reprodutivas, neuroendócrinas e imunes (BRZEZINSKI et al., 2005), além da atividade anti-inflamatória, anti-apoptótica e antioxidante (LI; ZHANG; TANG, 2013). Segundo Picinato (2002), a MEL ainda pode apresentar um papel no gasto energético, no controle glicêmico, na regulação da

massa corporal, e sobre a secreção e ação da insulina periférica. A melatonina pode apresentar também propriedades neuroprotetoras e antitumorais em muitas condições experimentais (RODRIGUEZ et al., 2013), além de intervir como moduladora da resposta imune (CARILLO-VICO et al., 2013), doenças ósseas (SANCHEZ-BARCELO et al., 2010) e doenças cardiovasculares (DOMINGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2012).

2.7.3 Melatonina e estresse oxidativo

A MEL tem a capacidade de sequestrar as EROs e de ERN, bem como os radicais orgânicos, prevenindo danos ao DNA, proteínas e lipídios de membranas (ALLEGRA et al., 2003), reduzindo, com isso, os danos oxidativos das moléculas encontradas em compartimentos lipídicos ou aquosos (TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005). A propriedade da melatonina de interagir com ROS ou RNS gera metabólitos que também possuem propriedades antioxidantes, tal como o N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) que sofre a retirada do grupo funcional formil dando origem ao também antioxidante N[1]-acetil-5- metoxiquinuramina (AMK) (GALANO et al., 2013). Indiretamente, este hormônio produz ação antioxidante por atenuar a produção de radicais livres através de efeitos antiinflamatórios, antiexcitatórios e por causar diminuição da expressão de enzimas pró-oxidantes, óxido nítrico sintetase e lipooxigenase (HARDELAND et al., 2006), como observado em ratos submetidos à injúria isquêmica cerebral e tratados com este hormônio (KOH, 2008).

Além disso, a melatonina também age como antioxidante de forma indireta por estimular o aumento da expressão e da atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione redutase e glicose-6-fosfato desidrogenase (PANDI-PERUMAL et al., 2013), atuando também na preservação dos níveis de glutathione no citoplasma e nas mitocôndrias (LUCHETTI et al., 2010). Os mecanismos ainda são incertos, mas existem evidências da ação antioxidante da melatonina através de seus receptores de membrana (CARRILO-VICO et al., 2004) ou através da inibição dos fatores de transcrição ROR α e NF- κ B, ambos envolvidos na transcrição de genes de enzimas pró e antioxidantes (DAI et al., 2001; LUCHETTI et al., 2010).

Diversos estudos demonstram a ação da MEL como um potente antioxidante (HE et al, 2016; ZHANG et al, 2016; KANG et al, 2016). De acordo, com Liu (2000), a melatonina apresenta a capacidade de aumentar atividade das enzimas superóxido desmutase e catalase em diversos tecidos. Da mesma forma, trabalho realizado por Barlow-Walde (1995) com cérebro de ratos, demonstra que a atividade da enzima glutathione peroxidase também é aumentada na presença da melatonina. Concordando os dados descritos por tais estudos, Albarran et al. (2001) relata que a atividade da superóxido desmutase pulmonar e cortical apresentam um ritmo circadiano que é sincrônico à produção de melatonina pela glândula pineal, sendo a atividade da enzima maior na presença de melatonina, sugerindo assim, uma potencialização pela melatonina.

Além de atuar no processo aterosclerótico como potente antioxidante, a melatonina ainda pode atuar minimizando os efeitos deletérios provocados pelo processo inflamatório, devido a presença de receptores para este hormônio nas células e órgãos do sistema imune apresentam (CARILLO-VICO et al., 2005). É sabido que os neutrófilos e monócitos apresentam receptores para melatonina em suas membranas (BARJAVEL et al, 1998).

Os possíveis mecanismos pelos quais a melatonina atua no processo inflamatório estão relacionados com: 1) Inibição da produção do óxido nítrico e redução da expressão da enzima óxido nítrico sintetase; 2) pela ativação do fator de transcrição NF-kB; 3) pela redução dos níveis de prostaglandinas e da expressão da ciclo-oxigenase e 4) redução do recrutamento de polimorfonucleares no sítio inflamado (CUZZOCREA, 2001b). Sabe-se também que a MEL produz efeito anti-inflamatório em locais periféricos, inibindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias (CUZZOCREA, 1997a). Confirmando estas hipóteses, estudos mostram que a inibição da síntese de MEL inibe respostas imunes celulares e humorais em camundongos (MAESTRONI, 1996).

Em resumo, a proteção antioxidante da MEL já foi demonstrada tanto in vivo como in vitro (REITER, 2000), esta ação antioxidante da melatonina parece agir por diferentes vias, como: pela sua capacidade em neutralizar os radicais livres, por estimular enzimas antioxidantes, por promover o aumento da eficiência da fosforilação oxidativa mitocondrial, por reduzir o vazamento de elétrons, que permite a diminuição dos radicais livres, além de aumentar a eficiência de outros antioxidantes (REITER, 2003).

2.7.4 Melatonina e inflamação

Além de apresentar atividade antioxidante, a MEL vem demonstrando exercer efeito anti-inflamatório em diferentes modelos experimentais (BECK et al, 2015; CHEN et al., 2015; CHEN et al, 20106). Por exemplo, Miller et al. (2006), demonstrou que a melatonina é capaz de aumentar a produção da IL-2, IL-6 e IFN γ em células mononucleares em cultura , além de induzir a produção da IL-12 e aumentar a atividade das células NK. Ainda, em monócitos, a melatonina induz a secreção de IL-6 e IL-10.

Segundo Chahbouniet al. (2010) a melatonina melhora a inflamação bloqueando fatores transcricionais e inibindo a ativação transcricional de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e interleucina1 (IL-1) e das enzimas inflamatórias COX-2 e iNOS. Tais resultados estão diretamente envolvidos na proteção celular exercida pela melatonina a partir do fator de transcrição NF- κ B (LUCHETTI et al., 2010). A inibição deste pela melatonina leva consequentemente, a redução da síntese de citocinas proinflamatórias como, por exemplo, as interleucinas (IL-2 e IL-6), o fator de necrose tumoral (TNF), moléculas de adesão e quimiotáticas e a isoforma induzida da sintase de óxido nítrico (iNOS), além de modular a expressão de genes anti e proapoptóticos (BHAKAR et al., 2002; BRUCK et al., 2004; KALTSCHMIDT et al., 2005).

Todavia, o mecanismo de ação da melatonina sobre a via de ativação deste fator de transcrição ainda não está estabelecido. Por fim, a melatonina apresenta múltiplas formas de gerar citoproteção associadas às diversas formas específicas de sinalizar, seja por meio da ação antioxidante, seja por meio da modulação do processo inflamatório.

Sabendo que na aterosclerose, a oxidação da LDL provoca uma lesão endotelial, culminando com o processo inflamatório, e que a resposta inflamatória, por sua vez, é um complexo processo de eventos que envolvem o recrutamento de leucócitos, a ativação de células endoteliais, a interação entre leucócitos e o endotélio vascular, ativação de macrófagos teciduais, do sistema do complemento, da cascata de coagulação e do sistema fibrinolítico, das plaquetas e a liberação de proteases e EROS originados das células fagocíticas (MEDZHITOV, 2008; THELEN; STEIN, 2008; BROKELMAN et al., 2011), é de fundamental o estabelecimento de uma terapia que assistam esses dois fatores, a oxidação e inflamação.

Sabe-se que a melatonina atua como o mais potente antioxidante natural, além de exercer efeitos hipolipemiante e no processo inflamatório (REITER et al., 2003) e que as estatinas são os fármacos mais recomendados no tratamento da hiperlipidemia (IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose). Sendo assim, partindo do pressuposto que ambas as substâncias exercem ações antiaterogênicas e que no processo de envelhecimento os animais cursam com redução do nível sérico de melatonina e que na literatura não há relatos desta associação, considera-se a hipótese de que a reposição de melatonina associada à administração da sinvastatina em ratos com 120 dias de idade possa reduzir os biomarcadores da peroxidação lipídica, das citocinas inflamatórias, dos parâmetros bioquímicos, bem como, alterações no tecido hepático e renal provocados pela hiperlipidemia induzida pelo Triton WR 1339.

Referências

- ABDELLAOUI, A.; AL-KHAFFAF, H. C-reactive protein (CRP) as a marker in peripheral vascular disease. **Eur J Vasc Endovasc Surg**. v.20, p.1-5, 2007.
- AGIL, A.; EL-HAMMADI, M.; JIMÉNEZ-ARANDA, A. Melatonin reduces hepatic mitochondrial dysfunction in diabetic obese rats. **J Pineal Res**. v.59, p.70-9, 2015.
- AIKAWA, M. et al. Direct anti-inflammatory mechanisms contribute to attenuation of experimental allograft arteriosclerosis by statins. **Circulation**. v.108, p.13-20, 2003.
- ALVES, R.S.C. et al. A. melatonina e o sono em crianças. **Pediatria**. v. 1, p. 587-594, 2004.
- ARAUJO, D.V. et al. Análise de Custo-Efetividade da Sinvastatina versus Atorvastatina na Prevenção Secundária de Eventos Cardiovasculares no Sistema Único de Saúde Brasileiro. **Value in health**. v. 14, p 29–32, 2011.
- BADIMON, L., PADRÓ, T.; VILAHUR, G. Atherosclerosis, platelets and thrombosis in acute ischaemic heart disease. **Eur Heart J Acute Cardiovasc Care**. v.1, p.60–74., 2012.
- BARFORD, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. **Curr Opin Struct Biol**. v.14, p.679-86, 2004.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BARTER, P. The inflammation: Lipoprotein cycle. **Atheros Suppl.** v.6, p.15-20, 2005.

BARTUŚ, M. et al. Hypertriglyceridemia but not hypercholesterolemia induces endothelial dysfunction in the rat. **Pharmacol Rep.** v.57, p.127-37, 2005.

BASSON, C.T. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. **J Am Coll Cardiol.** v.35, p.1-10, 2000.

BERTOLINI, G. L.; BAZOTTE, R. B. Fármacos Hipolipemiantes. In: CURI, R. et al. Entendendo a gordura - os ácidos graxos. Barueri: [s.n.], 2002, v. 1, p. 489-506.

BING, W. et al. Simvastatin improves the homing of BMSCs via the PI3K/AKT/miR-9 pathway. **J Cell Mol Med.** v.20, p.949-61, 2016.

BIRKEDAL-HANSEN, H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. **J Periodontol.** v.64, p.474-84, 2013.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D., COLLIN, F. Melatonin: Action as antioxidant and potential applications in human disease and aging. **Toxicology.** v.278, p.55–67, 2010.

BONOMINI F. Atherosclerosis and oxidative stress. **Histol Histopathol.** v.23, p. 381-90, 2008.

BOSE, K.S.; VYAS, P.; SINGH, M. Plasma non-enzymatic antioxidants-vitamin C, E, beta-carotenes, reduced glutathione levels and total antioxidant activity in oral sub mucous fibrosis. **Rev Med Pharmacol Sci.** v.16, p.530-2, 2012.

BOTREL, T.E.A. et al. Doenças cardiovasculares: causas e prevenção. **Rev Bras Clin Terap.** v. 26, p. 87-90, 2000.

BOURCIER, T.; LIBBY, P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.20, p.556-62, 2000.

BRITO. et al. Enzyme activity of superoxide dismutase and zincemia in women with preeclampsia. **Nutr Hosp.** v.28, p.486-90, 2013.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L. Scavenging for receptors. **Nature.** v.343, p.508-09, 2009.

BRUSQ, J.M. Inhibition of lipid synthesis through activation of AMK- Kinase: an additional mechanism for hypolipidemic effects of Beberine. **J Lipid Reses.** v.47, p.1281-8, 2006.

CASÓS, K et al. Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE-/- mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. **Atherosclerosis**, v. 201, p. 306-317, 2008.

CASTRO, K.F.; ARTONI, S.M.; PACHECO, M.R. Perfil lipídico sérico de ratos tratados com surfactante. **Braz J Vet Res Anim Sci.** V. 49, P.193-201, 2012.

CHEN, J. et al. Melatonin attenuates neurogenic pulmonary edema via the regulation of inflammation and apoptosis after subarachnoid hemorrhage in rats. **J Pineal Res.** v.59, p.469-77, 2015.

CHEN, S.J. et al. Melatonin enhances interleukin-10 expression and suppresses chemotaxis to inhibit inflammation in situ and reduce the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Int Immunopharmacol.** v.31, p.169-77, 2016.

CHOY, P.C.; SIOW, Y.L.; MYMIN, D.O.K. Lipids and atherosclerosis. **Biochem Cell Biol.** v.82, p.212-24, 2004.

CIOFU, O.; LYKKESFELDT, J. Antioxidant supplementation for lung disease in cystic fibrosis. **Cochrane Database Syst Rev.** v. 7, p.24-8, 2014.

COSTA, R.P.; SILVA, C.C. Doenças cardiovasculares. Em: Cuppari L. Nutrição clínica do adulto. Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar. UNIFESP/EPM. São Paulo: Manole, 2002.

COTRIM, P. et al. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. **Braz Dent J.** v.13, p. 1-10, 2002.

CUTLER, R.G. Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. **Ann N Y Acad Sci.** v.1055, p.93-135, 2005.

DANDONA, P. et al. Proinflammatory effects of glucose and anti-inflammatory effects of insulin: relevance to cardiovascular disease. **Am J Cardiol.** v.99, p.15-26, 2007.

DARVALL, K.A.L. et al. Obesity and thrombosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg.** .v.33, p.223-33, 2007.

DAVIDSON, M. H.; TOTH, P. P. Comparative effects of lipidlowering therapies. **Prog Cardiovasc Dis.** v. 47, p.73-104, 2004.

DUBOCOVICH ML1, MARKOWSKA M. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. **Endocrine.** V.27, p. 101-10, 2005.

DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I. Chronic activation of the innate immune system may underlie the metabolic syndrome. **Rev Paul Med.** v.119, p.122-7, 2001.

FALAGAS, M. et al. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. **J Antimicrob Chemother.** v.61, p.774-785, 2008.

FARACI, F.M.; DIDION, S.P. Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 24, p. 1367-73, 2004.

FERNÁNDEZ-CRUZ, E. et al. Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. **Food Chem.** v.15, p.431-7, 2017.

FOODY, J.M. et al. Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors in older persons with acute myocardial infarction: evidence for an age-statin interaction. **J Am Geriatr Soc.** v.54, p. 421-30, 2006.

FORTI, N.; DIAMENT, J. High-density lipoproteins: metabolic, clinical, epidemiological and therapeutic intervention aspects. **Arq Bras Cardiol.** v.87, p.671-9, 2006.

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipidemia. **Clin Chim Acta.** v.369, p.1-16, 2006.

GARCIA et al., 2011. Anti-inflammatory effect of high-density lipoprotein on the cardiovascular system of hyperlipidemic mice. **Rev Port Cardiol.** v. 30, p.763-9, 2016.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal.** V.19, p.1807-19, 2007.

GOETZ, M.E.; LUCH, A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. **Cancer Lett.** v.18, p.73-83, 2008.

GORRINI, C.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov.** v. 12, p. 931-47, 2013.

GRAESER, K. A. et al. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Cryst Growth Des.** v.8, p.128-135, 2008.

GRIENDLING KK. et al. Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: A scientific statement from the American Heart Association. **Circ Res.** v.119, p.39-75, 2016.

GRUNDY, S.M. et al. Implications of Recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program adult Treatment Panel III Guidelines. **Circulation.** v. 110, p.227-39, 2004.

HARAMAKI, N. et al. Fluvastatin alters platelet aggregability in patients with hypercholesterolemia: possible improvement of intraplatelet redox via HMG-CoA reductase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.27. p.1471-1478, 2007.

HARDELAND, R. et al. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Prog Neurobiol.** v.93, p.350-84, 2011.

HARISA, G.I. et al., Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats. **Eur J Pharm Sci.** v.1, p.62-71, 2017.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S.G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. **J Natl Cancer Inst.** v.93, p.178-93, 2001.

HIGASHI et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. **Trends Cardiovasc Med.** v.24, p.165-9, 2014.

HOFFMEYER, M. et al. Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation.** v.103, 598-3, 2001.

HULTHE J, FAGERBERG B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.22, p.1162-7, 2002.

HUNG, J. et al. Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.25, p.1268-73, 2005.

HUSSAIN, S.A. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. **J Pineal Res.** v.42, p.267-71, 2007.

IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras de Cardiol.** v.88, 2007.

KAGAMI, S. et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin inhibits proinflammatory cytokine production from murine mast cells. **Int Arch Allergy Immunol.** v.146, p.61-6, 2008.

KIM, Y. R.; HAN, K. H. Familial hypercholesterolemia and the atherosclerotic disease. **Korean Circ J.** v. 43, p.363-367, 2013.

KIM, J.Y. et al. Antioxidant properties of ascorbic acid in bulk oils at different relative humidity. **Food Chem.** v.1, p.302-7, 2015.

KOLANKIEWICZ, F; GIOVELLI, F.M.H.; BELLINASO M.L.B. Estudo do perfil lipídico e da prevalência de dislipidemias em adultos. **RBAC.** v.40, n. 4, p. 317-320, 2008.

KOLOMVOTSOU, A. et al. Adherence to Mediterranean diet and close supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. **Eur J Nutr.** v. 52, p.37-48, 2013.

KRITCHEVSKY, D.S.T. et al. Influence of graded levels of conjugated linoleic acid (CLA) on experimental atherosclerosis in rabbits. **Nutr Res.** v.22, p.1275-9, 2002.

KUMAR, D.; PARCHA, V.; MAITHANI, A.; DHULIA, I. Effect and evaluation of antihyperlipidemic activity guided isolated fraction from total methanol extract of *Salvadora oleoides* (Decne.) in Triton WR-1339 Induced hyperlipidemic rats. **Pharmacogn Mag**, v.8, p.314-8, 2012.

KUMAR, G. et al. The hypolipidemic activity of Ayurvedic medicine, Arogyavardhini vati in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic rats: A comparison with fenofibrate. **J Ayurveda Integr Med**. v.4, p.165-70, 2013.

KUMAR, N. et al. Sesamol treatment reduces plasma cholesterol and triacylglycerol levels in mouse models of acute and chronic hyperlipidemia. **Lipids**. v.48, p.633-8, 2013.

LANDMESSER U. et al. Simvastatin versus ezetimibe: pleiotropic and lipid-lowering effects on endothelial function in humans. **Circulation**. v.118, p.56-63, 2005.

LAUFS, U.; LIAO, J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. **J Biol Chem**. v.273, p.66-71, 2008.

LEVINE, S.; SALTZMAN, A. A procedure for inducing sustained hyperlipemia in rats by administration of a surfactant. **J Pharmacol Toxicol Methods**. v.55, p. 224-6, 2006.

LEVINE, S.; SALTZMAN, A. Lithium increases gastrointestinal tract weight of male or female rats but it increases body weight only in females. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. v.32, p.29-33, 2008.

LEWIS, G. F.; STEINER, G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. **Diabetes Care**. v. 19, p. 390-393, 1996.

LI, W.C. et al. Effects of simvastatin on the expression of inducible NOS in acute lung injury in septic rats. **Int J Clin Exp Pathol**. v.8, p. 106-11, 2015.

LIAO, J.K. Effects of statins on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition beyond low-density lipoprotein cholesterol. **Am J Cardiol**. v.96, p.24-33. 2005.

LIAO, J.K.; ZHOU, Q. Statins and cardiovascular diseases: From cholesterol lowering to pleiotropy. **Curr Pharm**. v.15, p.467 – 478, 2009.

LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**. v.420, p.868-74, 2002.

LIBBY, P.; RIDKER, P. M. Inflammation and atherothrombosis: from population biology and bench research to clinical practice. **J Am Coll Cardiol**. v. 48, A33-A46, 2006.

LIBBY, P. et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. **Circ. J.** v.74, p.213–220, 2010.

LINSEL-NITSCHKE, P.; TALL, A. R. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature.** v. 4,p. 193-205, 2005.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.25, p.29-38, 2005.

MAGANHIN, C.C. et al. Melatonin effects on the female genital system: a brief review]. **Rev Assoc Med Bras.** v.54, p. 267-71, 2008.

MANNING-TOBIN, J.J. et al. Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. **Arterioscler, Thromb Vasc Biol.** v.29, p.19-26, 2009.

MANO, Y. et al. Adherence to changing from brand-name to generic atorvastatin in newly treated patients: a retrospective cohort study using health insurance claims. **J Pharm Health Care Sci.** v.1, p.1-2, 2015.

MARONDE, E et al. Dynamics in enzymatic protein complexes offer a novel principle for the regulation of melatonin synthesis in the human pineal gland. **J Pineal Res.** v.51, p.145-55, 2011.

MARTINEZ, T.L.R. Dislipidemias: da teoria a pratica. São Paulo: Atheneu, 2004. 416p.

MASON, J.C. Statins and their role in vascular protection. **Clinical Science.** v.105, p.251-266, 2003.

MINEO, C. et al. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. **Circ Res.** v. 98, p. 1352- 1364, 2006.

MISHRA, S.K . et al. Antidyslipidemic effect and antioxidant activity of anthraquinone derivatives from Rheum emodi rhizomes in dyslipidemic rats. **J Nat Med.** v.68, p.363-71. 2014.

MONAGHAN,P.; METCALFE, N.B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Eco Lett.** v.12, p.75-92, 2009.

MONTERO, D. et al. Effect of antioxidant vitamin supplementation on endothelial function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Obes Rev.** v.15, p.107-16, 2014.

MOTTA, N.A. Anti-atherogenic effects of a new thienylacylhydrazone derivative, LASSBio-788, in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J Pharmacol Sci.** v.123, p.47-57, 2013.

MUHAMMAD, F. et al. Intracellular antioxidants dissolve man-made antioxidant nanoparticles: using redox vulnerability of nanocerium to develop a responsive drug delivery system. **ACS Appl Mater Interfaces**. v.6, p.424-33, 2014.

NABESHIMA, K. et al. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. **Pathol Int**. v.52, p.255-64, 2002

NORDØY, A. et al. Effects of atorvastatin and omega-3 fatty acids on LDL subfractions and postprandial hyperlipemia in patients with combined hyperlipemia. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v.11, p.7-16, 2001.

OLIVEIRA, M.F et al. On the pro-oxidant effects of haemozoin. **FEBS Lett**. v.13, p. 1-3, 2002.

OULMOUSEN, F. et al. Hypolipidemic and Anti-Atherogenic Extract of Fennel (Foeniculum Vulgare) Extract in an Experimental Model of Atherosclerosis Induced by Triton WR-1339. **Eur. J. Sci. Res**, v. 52, n. 1, p.91-99, 2011.

PANDI-PERUMAL, S.R. et al. The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. **Nat Clin Pract Neurol**. v.4, p. 436-47, 2008.

PACKARD, R. R. S.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clinical Chemistry**. v. 54, p. 24-38, 2008.

PÉREZ, C.; CANAL, J. R.; ROMERO, A.; TORRES, M. D. Experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia in rats. **Acta Physiol Hung**. v. 86, n. 1, p. 57-68, 1999.

PETROVAN, R.J. et al. DNA vaccination against VEGF receptor 2 reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.27, 1095-100, 2007.

PONTES GN. et al. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. **J Pineal Res**. v.41, p.136-41, 2006.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiol Rev**. v.88, p.1243-76, 2008.

PULINILKUNNIL, T. et al. Evidence for rapid "metabolic switching" through lipoprotein lipase occupation of endothelial-binding sites. **J Mol Cell Cardiol**. v.35, p.1093-103, 2003.

RADER, D.J.; DAUGHERTY, A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature**. v.451, p.904-913, 2008.

RAMOS, A.M. et al.. Inflammatory markers of cardiovascular disease in the elderly. **Arq Bras Cardiol**. v.92, p.221-228, 2009.

RAMOS, S.C. et al. The role of soluble fiber intake in patients under highly effective lipid-lowering therapy. **Nutr J**. v.10, p.75-89, 2011.

RAO, R.M. et al. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. **Circ Res**. v. 3, p. 234-47, 2007.

REBELLO, C.M. et al. Exogenous surfactant therapy--what is established and what still needs to be determined. **J Pediatr**. v.2, p.215,26, 2002.

RIDEOUT, T.C. et al. Phytosterols protect against diet-induced hypertriglyceridemia in Syrian golden hamsters. **Lipids Health Dis**. v.6, p.5-13, 2014.

RIFAI N, RIDKER PM. Population distributions of C-reactive protein in apparently healthy men and women in the United States: implication for clinical interpretation. **Clin Chem**. v.49, p.666-9, 2003.

RÖSEN, P.et al. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. **Diabetes Metab Res Rev**. v.17p.189-212, 2001..

ROSSI, M. et al., Dietary non-enzymatic antioxidant capacity and the risk of myocardial infarction: a case-control study in Italy. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v.24, p. 1246-51, 2014.

RUAN, H.; LODISH, H.F. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alfa. **Cytokine Growth Factor Rev**. v.14, p.447-55, 2003.

SAKODA, K et al. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **J Dent Res**. v.85, p.520-3, 2006.

SANZ, J.; FAYAD, Z.A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature**. v. 21, p.953-957, 2008.

SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias.

SESMILOM, G. et al. Inflammatory Cardiovascular Risk Markers in Women with Hypopituitarism. **J Clin Endocrinol Metab**. v.86, p.5774–81, 2000.

SHAFIEI, M. et al. The effect of superoxide dismutase mimetic and catalase on the quality of postthawed goat semen. **Theriogenology**. v.83, p. 1321-7, 2015.

SHIN, I.S. et al. Melatonin attenuates neutrophil inflammation and mucus secretion in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary diseases via the suppression of Erk-Sp1 signaling. **J Pineal Res.** v.58, p.50-60, 2015.

SIGNORI, L.U. et al. A. O papel da lipemia pós-prandial na gênese da aterosclerose: particularidades do Diabetes Mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**,v. 51, p. 222-231, 2007.

SINGH, U.; JIALAL, I. Oxidative stress and atherosclerosis. **Histol Histopathol.** v.13, p.129-42, 2006.

SOUZA, A.P.; LINE, S.RP. The biology of matrix metalloproteinases. **Rev Fac Odontol.** v.10, p.1-6, 2002.

SOUZA, J.R. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína-C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnivelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arq Bras Cardiol.** v.90, p.94- 99, 2008.

SOUZA, S.J. et al. Lipid profile of HIV- infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. **Rev Ass Med Bras.** v.59, n.2, p.186–198, 2013.

SOUZA, A.G. A dispensação farmacêutica e as situações de risco para o uso de medicamentos nas farmácias populares do Brasil em Belo Horizonte [Dissertação]. Montes Claros: Universidade Estadual de Montes Claros; 2010.

SRIVASTAVA, S.; SONKAR, R.; MISHRA, S.K.; TIWARI, A.; BALARAMNAVAR, V.M, MIR, S.; BHATIA, G.; SAXENA, A.K.; LAKSHMI V. Antidyslipidemic and antioxidant effects of novel Lupeol-derived chalcones. **Lipids**, v.48, p.1017-27, 2013.

SRINIVASAN V. et al. Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.** v.7, p.-25, 2013.

STEFFENS, S.; MACH, F. Inflammation and atherosclerosis. **Herz.** v. 29, p. 741-748, 2004

STEIN, E. A. An investigative look: Selective cholesterol absorption inhibitors-embarking on a new standard of care. **Am. J. Manag Care.** v. 8, n.1, p. 36-39, 2002.

STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis.** v. 202, p.321-9, 2009.

TAMURA, H. et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. **Fertil Steril.** v.92, p.328-43, 2009.

TEIXEIRA, B.C.; LOPES, A.L. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **J Vasc Bras.** v.13, p.108-115, 2014.

THOMPSON, G. R. Management of dyslipidaemia. **Heart**. v. 90, p. 949-955, 2004.

TONET, A.C. et al. Association between the -174 G/C promoter polymorphism of the interleukin-6 gene and cardiovascular disease risk factors in Brazilian older women. **Braz J Med Biol Res**. v.41, p.47-53, 2008.

TRACHOOTHAM, D. et al. Effective elimination of fludarabine-resistant CLL cells by PEITC through a redox-mediated mechanism. **Blood**. v. 112, p. 1912-22, 2008.

VALENTINE, J.S.; DOUCETTE, P.A.; ZITTIN, S. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. **Annu Rev Biochem**. 2005;74:563-93.

VAPAATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit**. v.7, p.1075-85, 2001.

VOGIATZI, G.; TOUSOULIS, D.; STEFANADIS, C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. **Hellenic J Cardiol**. v.50, p. 402-9, 2009.

YAN, Z.Q.; HANSSON, G.K. Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis. **Immunol Rev**. v.219, p.187-203, 2007.

YANG, Z.X. et al. Downregulation of miR-146a, cyclooxygenase-2 and advanced glycation end-products in simvastatin-treated older patients with hyperlipidemia. **Geriatr Gerontol Int**. v.16, p. 322-8, 2016.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**. v.44, p.381-6, 2004.

WILLERSON, J.T.; RIDKER, P.M. Inflammation as a cardiovascular risk factor. **Circulation**. v.109, p.2-10, 2004.

WOESSNER, J.R. The matrix metalloproteinase family. Matrix metalloproteinases. **Academic Press**. v. 8. p.1-14, 2008.

WÜRTZ, P.; WANG, Q.; SOININEN, P. Metabolomic Profiling of Statin Use and Genetic Inhibition of HMG-CoA Reductase. **J Am Coll Cardiol**. v. 15, p.1200-10, 2016.

IYER, D.; SHARMA, B.K.; PATIL, U.K. Isolation of bioactive phytoconstituent from *Alpinia galanga* L. with anti-hyperlipidemic activity. **J Diet Suppl**, v.10, p.309-17, 2013.

ZIELIŃSKA, M. et al. Melatonin, but not melatonin receptor agonists Neu-P11 and Neu-P67, attenuates TNBS-induced colitis in mice. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**. v.389, p.511-9, 2016.

ZHANG, Y. et al. Simvastatin inhibits angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice: possible role of ERK. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.29, p.1764-71, 2009.

ZOUARI, M. et al. Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 128, p. 195-205, 2016.

Capítulo II

Associação da melatonina à sinvastatina protege alterações metabólicas e danos hepáticos em ratos induzidos à hiperlipidemia

Laíse de Souza Elias¹, Clovis Lapa Neto¹, Aline Ferreira da Silva Mariano¹, Leucio Duarte Vieira Filho², Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira¹

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

² *Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Recife, Brasil*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos- Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

Resumo

Avaliou-se o efeito da associação da melatonina e sinvastatina nos parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo e histoquímica de fígado de ratos induzidos à dislipidemia. Utilizou-se 35 ratos machos com 150 dias de idade, que foram divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução à hiperlipidemia; GI: ratos induzidos à hiperlipidemia pelo TRITON WR 13339 e tratado com placebo; GIS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com sinvastatina; GIMs: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina simultaneamente; GIMsS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina e sinvastatina simultaneamente; GIM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina; GIMS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina e sinvastatina. A hiperlipidemia foi induzida pela administração intraperitoneal de Triton WR 1339 (400 mg/kg), a sinvastatina (40mg/kg) foi administrada via subcutânea e a melatonina (10mg/kg) administrada na água de beber dos animais. Foi realizada a análise bioquímica dos seguintes parâmetros: colesterol total, LDL, HDL, VLDL, triglicerídeos, PCR, TGO e TGP, o estresse oxidativo hepático, através da peroxidação lipídica (TBARS) e níveis de glutathione reduzida, além da mensuração das enzimas antioxidantes, catalase e superóxido desmutase, e a imunohistoquímica hepática. Os resultados mostraram que os animais dos grupos tratados com melatonina e sinvastatina, associados ou não, apresentaram parâmetros bioquímicos similares aos animais do grupo

controle, além disso, foram observados também nesses grupos, níveis de PCR e TBARS reduzidos, com valores mais significativos nos grupos GIMs e GIMs, além da elevação dos níveis de GSH, catalase e superóxido desmutase. Em relação à imunohistoquímica hepática, observou-se diferenças significativas entre os grupos, onde os grupos tratados com melatonina e sinvastatina apresentaram um aumento do nível de glicogênio hepático, quando comparada ao grupo induzido à hiperlipidemia. Tais resultados demonstram que a ação da melatonina administrada de forma isolada ou combinada com a sinvastatina atua como um agente protetor e reversor contra a toxicidade hepática induzida experimentalmente, favorecendo uma normalização no perfil bioquímico e estresse oxidativo.

Palavras-chave: hiperlipidemia, melatonina, sinvastatina, triton WR 1339, estresse oxidativo.

1. Introdução

A elevação de concentrações de lipoproteínas no sangue caracteriza o estado de hiperlipidemia (PETYAEV, 2015), sendo decorrente de fatores genéticos e/ou ambientais (KASSIM et al., 2010; YAMADA, 2011). Diversas evidências experimentais, metabólicas, clínicas e epidemiológicas, relatadas ao longo de várias décadas demonstraram que níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos estão correlacionados com maior incidência de doenças cardiovasculares (DCV) (LWIN-MM-KHIN et al., 2011).

O contínuo aumento dos níveis de lipídios na corrente sanguínea pode causar efeitos deletérios aos tecidos, como o fígado, coração e rins (DUARTE et al., 2009), devido a sua relação com o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e diminuição dos componentes antioxidantes (MELO et al., 2011), levando ao estresse oxidativo (SHUKLA; MISHRA; PAT, 2011). Como resultado da peroxidação lipídica, vários produtos são formados, como o malondialdeído e a proteína C reativa (PCR), levando a modificações nas estruturas das proteínas celulares (HUDSON et al., 2008). A oxidação lipídica tem contribuído para o estudo de substâncias com atividade antioxidante, as quais poderiam agir na prevenção do estresse oxidativo, reduzindo assim a oxidação da LDL e, conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento da DCV (FUHRMAN et al., 2005).

A melatonina (MEL) ou N-acetil-5-metoxitriptamina, é uma indolamina sintetizada pela glândula pineal, além de ser produzida em menor proporção por órgãos periféricos como retina, intestino e pele (TAN et al., 2016). Este hormônio apresenta a capacidade de sequestrar as espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN), atuando na prevenção ao dano

oxidativo (ALVES et al., 2004). Além disso, a melatonina atua inibindo a ação de enzimas pró-oxidantes envolvidos na síntese do óxido nítrico e lipoxigenases (HARDELAND, 2005), inibe as enzimas da família citocromo P450 (CUZZOCREA; REITER, 2001), estimula a expressão de enzimas antioxidantes, como glutathione peroxidase e superóxido desmutase (TAMURA et al., 2017), e pode apresentar atividade anti-inflamatória e antiapoptótica (LI; ZHANG; TANG, 2013). O tecido hepático apresenta receptores para a MEL (PESCHKE; BAHR; MUHLAUER, 2013), os receptores MT1 e MT2, dessa forma, a MEL tem apresentado efeitos hepatoprotetor em uma série de modelos de lesão hepática, como na hepatite viral (LALIENA; SAN MIGUEL; CRESPO, 2012), fibrose hepática (KANG; HONG; LEE, 2016), isquemia/reperfusão (KANG; KOH; LEE, 2011). Estudo de Zhang et al. (2017) verificou que a melatonina atenua as alterações histopatológicas hepáticas, além de reduzir os marcadores do estresse oxidativo em ratos induzidos a alterações hepáticas por As₂O₃ (trióxido de arsênico), em outro estudo, Shilian et al. (2009) relatou o papel anti-inflamatório da melatonina em células de Kupffer com a redução de citocinas inflamatórias.

Atualmente, as estatinas são os fármacos mais efetivos no tratamento da hiperlipidemia, atuando na adequação dos níveis lipídicos sanguíneos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007). Estes fármacos atuam na via limitante da síntese do colesterol, inibindo a ação da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A redutase (HMG-CoA Redutase) e, conseqüentemente, reduzindo os níveis séricos de colesterol sanguíneo (GOLDENBERG; GLUECK, 2000). Além de exibir efeitos hiperlipidêmicos, atualmente, as estatinas têm demonstrado efeitos na diminuição do estresse oxidativo (WANG et al., 2017), através da regulação de vias moleculares da NADPH oxidase e óxido nítrico sintetase (ANTONPOULOS et al., 2012), e como anti-inflamatória, por provocar um down regulation nas citocinas inflamatórias (GRAMS et al., 2016). A sinvastatina é um membro da classe desse fármaco, sendo a segunda estatina mais potente e a mais prescrita no Brasil (GRAESER et al., 2008) por apresentar um menor custo e maior efetividade (ARAUJO et al., 2011; HARISA; BADRAN, 2015).

Partindo do pressuposto que a melatonina e sinvastatina exercem ações hipolipemiantes e que no processo de envelhecimento os animais cursam com redução do nível sérico de melatonina, a presente pesquisa teve o objetivo de testar a hipótese de que a reposição crônica de melatonina associada à administração da sinvastatina possa reduzir os biomarcadores da hiperlipidemia no fígado através de parâmetros bioquímicos, estresse oxidativo e imunohistoquímica hepática.

2. Material e Métodos

2.1. Grupos experimentais

Foram utilizados 35 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) com 150 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para isto, este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética (processo de número: 23082.015842). Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água ad libitum, temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais foram pesados, submetidos à avaliação bioquímica para verificação dos parâmetros bioquímicos (Tabela 1), em seguida, divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais: GC: ratas sem indução à hiperlipidemia; GI: ratos induzidos à hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 e tratado com placebo; GIS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com sinvastatina; GIMs: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratadas com melatonina simultaneamente; GIMsS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratadas com melatonina e sinvastatina simultaneamente; GIM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina; GISM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina e sinvastatina.

2.2. Indução da hiperlipidemia

Para induzir a hiperlipidemia foi administrado durante vinte dias, por via intraperitoneal, Triton WR 1339, também conhecido como tyloxapol (Sigma Aldrich), um detergente não aniônico de estrutura polimérica, na dose de 400mg/Kg de peso corporal, dissolvido em NaCl à 0,9% de acordo com o protocolo descrito por Jingjing e Xiangrong (2007). Esta substância tem sido utilizada em trabalhos experimentais por ser capaz de causar hiperlipidemia em animais (SHARMA, 1979). Para verificação da hiperlipidemia, após o terceiro dia de indução foi realizado análises bioquímicas, para tal, utilizou-se kits da Labtest[®], seguindo os catálogos especificados: LDL, HDL, triglicerídeos e colesterol total. Os animais não induzidos à hiperlipidemia (GC) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina.

2.3. Administração da sinvastatina

Os animais dos grupos GIII, GVI e GVII foram tratados com 40 mg/Kg de sinvastatina por via subcutânea, segundo metodologia de Padulla et al., (2009). Essa dose tem sido utilizada em diferentes estudos experimentais (LIBEROPOULOS et al., 2013; FOUCHER et al., 2015; HERNANDEZ-MIJARES et al., 2016).

2.4. Administração da melatonina

A melatonina (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo) foi administrada via oral (VO), para isso, 10 mg/Kg de melatonina foi dissolvida em 200 microlitros de álcool (OZGUNER; BARDAK; COMLEKCI, 2006). Essa dose tem sido utilizada em diferentes estudos experimentais (BUTUN et al., 2013; TANG et al., 2016). Em seguida, no horário das sete horas da manhã, esta solução foi diluída na água de beber dos animais, vale salientar que as garrafas foram revestidas por papel alumínio para proteger o conteúdo da luminosidade, segundo metodologia de Agil et al., 2013.

2.5. Análise bioquímica

As amostras de sangue foram coletadas nos períodos antes da indução da hiperlipidemia para confirmação da indução e após o tratamento. Para análise antes do período da indução e confirmação da indução, os ratos foram mobilizados por contensor mecânico e o sangue coletado por punção caudal lateral com o uso de cateter (24G) (PEREIRA, 2001) Já para a análise após indução e seu respectivo tratamento, o sangue foi coletado por punção cardíaca. O material foi rapidamente centrifugado, o sobrenadante acondicionado em Eppendorf e mantido em freezer a -20°C até o momento das dosagens. Para tal, utilizou-se kits da Labtest®, seguindo os catálogos especificados: Colesterol total (76-2/100), HDL (86-2/30), LDL (129-1/80), Triglicerídeos (87-2/100), VLDL, AST (109-4/30) e ALT (108-4/30). As amostras foram analisadas em triplicata em um analisador bioquímico (BioPlus 200f).

2.6. Análise da proteína C-reativa (PCR)

A análise da PCR foi avaliada por meio do método de aglutinação do látex semiquantitativo seguindo protocolo descrito por LIMA et al., 2007.

2.7. Marcadores do estresse oxidativo hepático

2.7.1. Análise da peroxidação lipídica e glutatona reduzida

A peroxidação lipídica foi estimada através da medida dos níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979), enquanto a glutatona reduzida (GSH) foi determinada através da mensuração de grupamentos sulfídrilas não proteicos (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Para isso, fragmentos do fígado foram macerados em KCl, 1, 15% numa proporção de 10 ml/1g até completa homogeneização do material coletado. O homogenato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2mL de reagente (0,375% ácido tiobarbitúrico e 75% ácido tricloroacético) para cada mL da mistura. Os tubos em duplicata foram lacrados e aquecidos em banho maria (100 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado e a absorvância medida a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978).

2.7.2. Atividade das enzimas antioxidantes

O sangue foi centrifugado, o sobrenadante acondicionado em Eppendorf e mantido em freezer a -20°C até o momento das dosagens. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução salina 0,9% e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi hemolisado com β -mercaptoetanol 0,27 M pH 7,0. Este hemolisado foi utilizado para determinar a atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (HAGYMASI et al., 2001). Segundo Misra e Fridovich (1972), a análise das atividades das superóxido dismutase (SOD) em eritrócitos é baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A análise da atividade da enzima Catalase (CAT) em eritrócitos é baseada em medir a diminuição de peróxido de hidrogênio, de acordo com Aebi (1984).

2.8. Histoquímica do fígado

Para avaliar o teor de glicogênio, fragmentos hepáticos foram dissecados e fixados em solução contendo formalina a 10% tamponada por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de etanol, dois banhos de tolueno e incluídos em parafina. Para a detecção do glicogênio, as lâminas foram pré-tratadas

com xileno para remoção de parafina e hidratadas com série decrescentes de etanol. Em seguida, os cortes foram corados pela técnica de coloração pelo Ácido Periódico de Schiff. Em seguida, cinco imagens/grupos, com a mesma ampliação, foram analisadas para a quantificação do glicogênio por meio do software Gimp 2.6. As avaliações foram realizadas com o auxílio de um Microscópio Leica DM 500 acoplado com câmera Leica ICC50HD e Software LAS EZ 4.3.

2.9. Análise Estatística

A análise estatística das análises bioquímicas e marcadores do estresse hepático foram realizadas por meio do método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

3. Resultados e discussão

A análise bioquímica do grupo GI evidenciou um aumento nos níveis de colesterol total, LDL, VLDL, triglicerídeos, ALT, AST, além da redução do nível de HDL (Tabela 2), verificando assim, que o Triton WR 1339 foi capaz de induzir a hiperlipidemia, pois aumentou significativamente os níveis plasmáticos de colesterol total, LDL e triglicerídeos quando comparado com o grupo controle concordando com diversos trabalhos (KUMAR et al., 2012; KUMAR et al., 2013; SRIVASTAVA et al., 2013; IYER; PATIL, 2014).

Após a instalação do modelo experimental e seus respectivos tratamentos foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quando avaliado o perfil bioquímico. A utilização da sinvastatina de forma isolada promoveu alterações lipídicas similares ao grupo GC, demonstrando assim que a sinvastatina atua inibindo a ação da enzima HMG-CoA redutase, consequentemente, inibindo a biossíntese hepática do colesterol (DAVIDSON; TOTH, 2004; PORTELA et al., 2014). Além da redução dos níveis de colesterol, a sinvastatina foi capaz de atenuar os níveis de triglicerídeos e LDL, por provocar um *up regulation* dos receptores de LDL, além de promover o aumento do HDL, concordando com resultados descritos por Linarelli e Pott (2008).

Em nosso estudo, a melatonina aplicada de forma isolada concomitante à indução demonstrou redução significativa em comparação com o grupo hiperlipidêmico (GI), porém, em relação ao grupo controle não foi observado nenhuma alteração significativa. Por outro lado, a melatonina quando aplicada após à indução da hiperlipidemia, provocou uma redução significativa quando comparada tanto ao grupo hiperlipidêmico quanto ao grupo controle. Tais

resultados demonstram o papel da melatonina na prevenção e recuperação dos níveis basais de lipídios, atuando assim, como uma substância antihiperlipidêmica. Esses achados corroboram os resultados de Sener et al. (2004), que relataram a redução dos níveis de triglicerídeos e colesterol hepáticos em camundongos submetidos à dieta rica em colesterol, da mesma forma, Srinivasan et al. (2013) observou que a melatonina produziu alterações no perfil lipídico, quando avaliado os níveis de LDL, colesterol e triglicerídeos, em animais induzidos à síndrome metabólica. Segundo Nduhirabandi; Du Toit; Locher (2012); Rios-Lugo et al. (2010), a administração de melatonina (4-10 mgKg⁻¹) durante 8 a 12 semanas reduziu significativamente os níveis plasmáticos de glicose, TG, colesterol total e leptina em ratos com obesidade induzida por dieta rica em gordura. Em estudo realizado por She et al. (2009), além da redução dos parâmetros observados nos trabalhos descritos acima, foi observado também um aumento dos níveis de HDL-colesterol. Os efeitos da melatonina observados no presente trabalho podem ser exercidos pela interação da melatonina com receptores MT1 e MT2 que existem em diferentes tecidos (SRINIVASAN et al., 2013), como no fígado, apresentando receptores tanto na membrana como na carioteca das células hepáticas (NAJI et al, 2014).

A análise bioquímica dos grupos com associação da melatonina com sinvastatina (GIMSs e GIMS) demonstrou um efeito mais expressivo na redução dos parâmetros colesterol total, VLDL, LDL, triglicerídeos, além do aumento dos níveis de HDL, demonstrando que a associação da melatonina com a sinvastatina atua de forma mais potente como agente protetor e reversor do perfil lipídico em resposta à hiperlipidemia. Tais achados podem ser explicados pelo fato da melatonina plasmática controlar o transporte de ácidos graxos através de uma via de transdução de sinal acoplada a proteína Gi- mediada pelo receptor que leva a reduzir o AMPc , inibindo o transporte de ácidos graxos (SAUER; DAUCHY; BLASH, 2001), diminuindo assim, a concentração lipídica, além de apresentar efeito direto no tecido adiposo e efeitos indiretos pelo sistema nervoso simpático (PRUNET- MARCASSUS et al, 2001) associado à atividade hipolipemiante da sinvastatina ao bloquear a HMG-CoA (PORTELA et al., 2014).

A concentração sérica das enzimas ALT e AST mostrou-se reduzida nos grupos tratados com melatonina e /ou sinvastatina, quando comparadas ao grupo hiperlipidêmico, porém, não apresentou diferenças estatísticas quando comparado ao grupo controle, tais achados estão de acordo com a literatura, pois, segundo Czechowska et al. (2015), a melatonina na dosagem de 10 mg/kg provocou redução da AST e ALT em ratos com fibrose hepática. Outro trabalho realizado por Henderson e Forbes (2008), demonstrou que a melatonina na dose de 25 mg/Kg reduziu os níveis das enzimas hepáticas em ratos com hepatotoxicidade provocada pelo CCL4.

Diante do fato, que as enzimas transaminases ALT e AST são indicadores sensíveis de dano hepático, particularmente quando se trata de uma lesão aguda (SCHINONI; PARANÁ 2006), a avaliação das atividades de AST e ALT demonstrou efeitos protetores da melatonina ao dano hepático. Cao et al. (2017), ao verificar os efeitos da melatonina na dose de 10mg/kg na lesão hepática provocada pelo cádmio, verificou redução dos níveis das enzimas hepáticas, além da redução dos marcadores inflamatórios, justificando que essa proteção pode ser conferida devido ao fato que a melatonina é capaz de inibir a expressão da via inflamassoma TXNIP-NLRP3, ativada pelo estresse oxidativo, culminando na liberação da IL-1 β , que provoca a morte dos hepatócitos e aumento das enzimas hepáticas, contribuindo assim, para a lesão deste órgão.

A PCR é um marcador inflamatório, sintetizada nos hepatócitos sob estímulo primário da IL-6 (GOMES-FILHO et al., 2011). Em condições inflamatórias agudas, há elevação de seus níveis no período de seis a oito horas iniciais, podendo atingir valores de até 300 mg/dl em 48 horas (STEFFEL; LUSCHER., 2009), gerando um aumento na produção de ânions superóxido, oxidação de LDL e peroxidação lipídica (WON et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que a sinvastatina e melatonina administrada de forma isolada foram capazes de reduzir os níveis da PCR, apresentando níveis similares ao grupo controle, porém, a redução desta proteína foi potencializada quando associou-se a melatonina com a sinvastatina (Figura 1), indicando assim, que esta associação aumentou o efeito inibitório sobre os níveis de PCR.

Diversos estudos têm demonstrado o efeito da sinvastatina em diminuir os níveis de PCR em ratos hiperlipidêmicos (PAULSEN, 2010; SEO, 2012; ABDEL-ZAHER et al., 2014). Nossos resultados concordam com Krysiak e Okopien (2011), que observou que a sinvastatina na dosagem de 40 mg/kg diminuiu significativamente em cerca de 30% os níveis de PCR em pacientes com dislipidemia. Postula-se que as estatinas influenciam as PCR por meio da diminuição da expressão monocitária de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1) e por provocar down-regulation na transcrição do gene da PCR (FERRO et al., 2000; KLEEMANN et al., 2004).

Segundo Mesri et. (2015), a suplementação de 6mg/dia de melatonina reduziu significativamente a resposta inflamatória em mulheres obesas através da diminuição de citocinas inflamatórias, dentre elas, a PCR. Sabe-se também que a PCR encontram-se aumentadas em humanos em condições de privação de sono, onde é observada a redução dos níveis basais de melatonina (VOLP et al, 2008), além disso, o estudo in vivo realizado por Jung et al. (2010) mostraram que a administração de melatonina (50 mg/ kg) em ratos inibiu a expressão de mRNA de IL-6, consequentemente de melatonina, já Veneroso et al., 2009 e

Cichoz-Lach et al., 2010, utilizando doses menores de melatonina em ratos, 1mg/kg) e 5 mg/Kg, respectivamente, observou a diminuição dos níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-6, logo, observando também a diminuição dos níveis da PCR.

As análises dos níveis de TBARS no tecido hepático após indução à hiperlipidemia revelaram valores elevados quando comparados ao grupo controle. Porém, entre os grupos tratados com melatonina (concomitantemente ou após a indução) ou sinvastatina, evidenciou valores semelhantes ao grupo controle (GC). Esses resultados corroboram diversos trabalhos, Catalão et al. (2016), por exemplo, investigando o efeito antioxidante da sinvastatina e seu possível papel neuroprotetor durante a sepse experimental demonstrou uma redução expressiva nos níveis de TBARS ($P < 0,01$), da mesma forma, Abbas e Sakr. (2013) observando o efeito da sinvastatina em ratos hipercolesterolêmicos, percebeu a diminuição dos níveis de TBARS hepáticos. A melatonina, por sua vez, apresenta um efeito antioxidante bem documentado na literatura em diversos trabalhos (SIGALA et al, 2006; OGETURK et al, 2008; CAO et al., 2017). De acordo com Hong, Xu e Mei (2009), a indução de fibrose hepática pelo CCL₄, provocou efeitos na redução dos níveis de TBARS, quando tratados com melatonina na dose de 5 ou 10 mg/Kg, em estudo de Aranda, Albendea e Lostale (2010) também com fibrose hepática induzida por CCL₄, o nível de peroxidação lipídica hepática foi reduzida em 93,4% nos animais tratados com 10 mg/kg de melatonina, sugerindo que a melatonina diminui a peroxidação lipídica e desempenha um papel antioxidante em fibrose hepática induzida por CCL₄ em ratos.

A associação da melatonina com sinvastatina nos grupos GIMSs e GIMS foi capaz de atenuar de forma mais expressiva os níveis de TBARS (Figura 2), corroborando estudo de Dayoub et al. (2011), que ao testar os efeitos da associação da melatonina com atorvastatina em ratos induzidos por LPS, verificou uma diminuição da peroxidação lipídica, de radicais livres e IL-6, além da maior expressão da proteína eNOS (óxido nítrico sintetase endotelial). Estes dados sugerem que a MEL melhora os efeitos benéficos das estatinas, aumentando a expressão da eNOS, prevenindo as ações prejudiciais da estatina e reduzindo a reação inflamatória e geração de EROs.

A exposição à hiperlipidemia promoveu redução dos níveis de GSH quando comparada ao grupo controle, todavia, nos grupos com tratamento com melatonina e /ou sinvastatina concomitantemente ou após a indução, houve redução com valores semelhantes ao controle no grupo GIMS e superiores ao controle nos grupos GIM, GIMSs e GIMS, já no grupo GIS ocorreu uma diminuição dos níveis quando comparado ao grupo GI, porém, não houve diferença significativa quando comparada ao grupo controle (Figura 3). Alguns estudos

recentes vêm testando o efeito da sinvastatina no estresse oxidativo, Harisa, Alomrani e Badran (2017), verificou o aumento da razão GSH/GSSH dos eritrócitos em ratos hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR1339 e tratados com sinvastatina, outro estudo realizado por Goodarzi e Ahmadizadeh. (2017), verificou que o pré-tratamento dos animais com sinvastatina na dosagem de 20 mg/kg aumentou acentuadamente os níveis de GSH em ratos com lesão renal aguda promovida pelo cromo. Inúmeros trabalhos são relatados demonstrando o efeito isolado da melatonina na promoção dos níveis de GSH, por exemplo, Czechowska et al. (2015), demonstraram uma elevação dos níveis de GSH em animais com danos hepáticos induzidos por tioacetamida (TAA) e tratadas com melatonina (10 mg/kg) e Goc et al. (2017) observaram níveis elevados de GSH no tecido hepático dos animais tratados com 10 mg/kg de MEL isolada ou em combinação com o nitroprussiato de sódio (SNP), um fármaco anti-hipertensivo com efeitos tóxicos, em comparação com a administração de SNP isolado.

Nossos resultados demonstram um aumento nos níveis de GSH quando a melatonina foi associada a sinvastatina, concordando com estudo de Mehrzadi et al. (2016), que ao avaliar a eficácia da combinação de melatonina com atorvastatina (ATO) contra a nefrotoxicidade induzida por gentamicina em ratos observaram uma elevação dos níveis de GSH quando comparado ao grupo nefrotóxico e nefrotóxico tratado com atorvastatina isolada, demonstrando assim, que a terapia combinada de MEL mais ATO aumentou os efeitos benéficos contra o estresse oxidativo, atenuando a lesão renal, este fato pode está relacionado a potencialização da melatonina pelas estatinas, acarretando no aumento da concentração intracelular de GSH por estimulação da sua taxa enzima limitante, a γ -glutamylcisteína sintase.

As figuras 4 e 5, respectivamente, apresentam os valores da atividade da enzima antioxidante catalase e superóxido desmutase mais significativo para os grupos GIMs e GIMS, além de valores semelhantes ao GC nos grupos GIS, GIMs e GIM. Demonstrando assim, que a exposição à hiperlipidemia promoveu redução dos níveis de catalase e superóxido quando comparada ao grupo controle, e que o tratamento com melatonina e/ou sinvastatina concomitantemente ou após a indução, promoveu a prevenção da redução dos níveis da catalase. Sabendo que a melatonina isolada mostra-se eficiente na elevação dos níveis de catalase e devido a sua disponibilidade e fácil penetração celular nos diferentes tecidos (REITER et al, 2007) e por sua capacidade em estimular a expressão de enzimas antioxidantes (PANDI-PERUMAL et al., 2013) e de outros antioxidantes; e que além dos efeitos antihipercolesterolêmicos, as estatinas podem está envolvidas na inibição do estresse oxidativo ao atuar em vias geradoras de espécies oxidantes (HERNANDEZ-PRESA; MARTIN-VENTURA; ORTEGO et al., 2002), justificando nossos resultados, onde a associação da

melatonina à sinvastatina mostrou efeitos mais positivos sobre as enzimas antioxidantes. Concordando com tais achados, a associação da melatonina com atorvastatina demonstrou um aumento das enzimas antioxidantes SOD e CAT (DAYOUB et al., 2011; MEHRZADI et al., 2016).

Os animais dos grupos GI diferiram significativamente em relação à quantidade de glicogênio hepático, que se encontrava reduzida, quando comparada com os animais do grupo GC e demais grupos. Além disso, os grupos GIS, GIMs, GIM e GIMs e GIMS diferiram significativamente entre si em relação à quantidade de glicogênio hepático (Figura 6). Sabe-se que a melatonina pode afetar o metabolismo da glicose e secreção de insulina do pâncreas (HEVIA et al., 2015), justificando assim, justificando assim nossos resultados, onde a melatonina e sinvastatina foram eficientes na reposição do glicogênio hepático em resposta à diminuição pela hiperlipidemia.

4. Conclusão

No presente trabalho foi possível observar os efeitos da associação da melatonina com sinvastatina na potencialização da redução do estresse oxidativo, perfil lipídico, moléculas inflamatórias e reposição do glicogênio hepático.

5. Referências

- ABBAS, A. M; SAKR, H. F. Simvastatin and vitamin E effects on cardiac and hepatic oxidative stress in rats fed on high fat diet. **J Physiol Biochem.** v.69, p.737-50.
- ABDEL-ZAHER, A. O., et al. Effect of simvastatin on the antihypertensive activity of losartan in hypertensive hypercholesterolemic animals and patients: role of nitric oxide, oxidative stress, and high-sensitivity C-reactive protein. **Fundam Clin Pharmacol.** v.28, p.237-48, 2014.
- AEBI,H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymol.** v. 105, p.121-126, 1984.
- AGIL, A. et al. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res.** v. 54, p.381–388, 2013.
- ALVES, R.S.C. et al. A. melatonina e o sono em crianças. **Pediatria.** v. 1, p. 587-594, 2004.
- ANTONOPOULOS, A. S. et al. Translating the effects of statins: From redox regulation to suppression of vascular wall inflammation. **Thromb Haemost.** v.108, p.840-8, 2012.
- ARANDA, M. et al. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. **J Pineal Res.** v.49, p.78-85, 2010.

ARAUJO, D.V. et al. Análise de Custo-Efetividade da Sinvastatina versus Atorvastatina na Prevenção Secundária de Eventos Cardiovasculares no Sistema Único de Saúde Brasileiro. **Value in health**. v. 14, p 29–32, 2011.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimol.** v. 52, p. 302-310, 1978.

BUTUN, I. et al. The effects of different doses of melatonin on lipid peroxidation in diet-induced hypercholesterolemic rats. **Bratisl Lek Listy**. v.114, p.129-32, 2013.

CAO, Z. et al. Melatonin alleviates cadmium-induced liver injury by inhibiting the TXNIP-NLRP3 inflammasome. **J Pineal Res**. 2017.

CATALÃO, C. H. et al. Brain Oxidative Stress During Experimental Sepsis Is Attenuated by Simvastatin Administration. **Mol Neurobiol**. v. 28, p. 1-10, 2016.

CICHOZ-LACH, H. et al. The effects of l-tryptophan and melatonin on selected biochemical parameters in patients with steatohepatitis. **J Physiol Pharmacol**. v.61, p.577–580, 2010.

CUZZOCREA, S.; REITER, R. J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol**. v. 426, p.1-10, 2001.

CZECHOWSKA, G. et al. Protective effects of melatonin against thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. **J Physiol Pharmacol**. v.66, p.567-79, 2015.

DAVIDSON, M. H.; TOTH, P. P. Comparative effects of lipid-lowering therapies. **Prog Cardiovasc Dis**. v.47, p.73-104, 2004.

DAYOUB, J. C. et al. Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide. **J Pineal Res**. v.51, p.324-30, 2011.

DUARTE, M. M. et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. **Clin Biochem**. v.42, p.666-671, 2009.

FERRO, D. et al. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. **J Am Coll Cardiol**. v.36, p.427–431, 2000.

FOUCHER, C. et al. New Fixed-Dose Combinations of Fenofibrate/Simvastatin Therapy Significantly Improve the Lipid Profile of High-Risk Patients with Mixed Dyslipidemia Versus Monotherapies. **Cardiovasc Ther**. v. 33, p.329-37, 2015.

FUHRMAN, B. et al. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E⁰) mice and reduce macrophage atherogenicity. **J Nutri**. v. 135, p.722-728, 2005.

GOC, Z. et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP. **Chin J Physiol.** v.1, p. 28-34 2017.

GOLDENBERG, N.; GLUECK, C. Efficacy, effectiveness and real life goal attainment of statins in managing cardiovascular risk. **Vasc Health Risk Manag.** v. 5, p.369-376, 2009.

GOODARZI, Z K. E.; AHMADIZADEH, M. Simvastatin attenuates chromium-induced nephrotoxicity in rats. **J Nephropathol.** v.1, p.5-9, 2017.

GOMES-FILHO, I. S. et al. Chronic periodontitis and C-reactive protein levels. **J Periodontol.** v.7, p.969-978, 2011.

GRAESER, K. A. et al. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Cryst Growth Des.** v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

GRAMS, M. E. et al. Acute kidney injury after major surgery: A retrospective analysis of veterans health administration data. **Am J Kidney Dis.** v.67, p.872-80, 2016.

HAGYMASI, K. A. et al. Oxidative damage in alcoholic liver disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol.** v. 13, n.1, p.49-53, 2001.

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine.** v. 27, p. 111-118, 2005.

HARISA, G. I.; ALOMRANI, A. H.; BADRAN, M. M. Simvastatin-loaded nanostructured lipid carriers attenuate the atherogenic risk of erythrocytes in hyperlipidemic rats. **Eur J Pharm Sci.** v.1, p.62-71, 2017.

HARISA, G. I.; BADRAN, M. M. Simvastatin nanolipid carriers decreased hypercholesterolemia induced cholesterol inclusion and phosphatidylserine exposure on human erythrocytes. **J Mol Liq.** v.208, p.202–210, 2015.

HERNANDEZ-MIJARES, A. et al. Effects of simvastatin, ezetimibe and simvastatin/ezetimibe on mitochondrial function and leukocyte/endothelial cell interactions in patients with hypercholesterolemia. **Atherosclerosis.** v.247, p.40-7, 2016.

HERNANDEZ-PRESA, M. A.; MARTIN-VENTURA, J. L.; ORTEGO, M. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis.** v.160, p.49–58, 2002.

HENDERSON, N. C.; FORBES, S. J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. **Toxicology.** v.254, p.130-135, 2008.

HEVIA, D. et al. Melatonin uptake through glucose transporters: a new target for melatonin inhibition of cancer. **J Pineal Res.** v.58, p.234-50, 2015.

HONG, R. T.; XU, J. M.; MEI, Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. **World J Gastroenterol.** v.15, p.1452-1460, 2009.

HUDSON, M. B. et al. The effect of resistance exercise on humoral markers of oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc.** v.40, p.542-8, 2008.

IYER, D.; PATIL, U. K. Evaluation of antihyperlipidemic and antitumor activities of isolated coumarins from *Salvadora indica*. **Pharm Biol.** v. 52, p78-85, 2014.

JUNG, K. H, et al. Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. **J Pineal Res.** v.48, p. 239–250, 2010.

KANG, J. W.; KOH, E. J.; LEE, S. M. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway. **J Pineal Res.** v.50, p. 403-411, 2011.

KANG, J. W.; HONG, J. M.; LEE, S. M. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. **J Pineal Res.** v.60, p.383-393, 2016.

KASSIM, S.H. et al. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. **PLoS One.** V. 19, p. 5-10, 2010.

KLEEMANN, R. et al. T. Evidence for anti-inflammatory activity of statins and PPARalpha activators in human C-reactive protein transgenic mice in vivo and in cultured human hepatocytes in vitro. **Blood.** v.103, p.4188–4194, 2004.

KRYSIAK, R.; OKOPIEN, B. The effect of ezetimibe and simvastatin on monocyte cytokine release in patients with isolated hypercholesterolemia. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 57, p.505 – 12, 2011.

KUMAR, D. et al. Effect and evaluation of antihyperlipidemic activity guided isolated fraction from total methanol extract of *Salvadora oleoides* (Decne.) in Triton WR-1339 Induced hyperlipidemic rats. **Pharmacogn Mag.** v.8, p.314-8, 2012.

KUMAR, G. et al. The hypolipidemic activity of Ayurvedic medicine, Arogyavardhini vati in Triton WR-1339-induced hyperlipidemic rats: A comparison with fenofibrate. **J Ayurveda Integr Med.** v.4, p.165-70, 2013.

LALIENA, A.; SAN MIGUEL, B.; CRESPO, I. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. **J Pineal Res.** v.53, p.270-278, 2012.

LI, X.; ZHANG, M.; TANG, W. Effects of melatonin on streptozotocin-induced retina neuronal apoptosis in high blood glucose rat. **Neurochem Res.** v.38, p.669-76, 2013.

LIBEROPOULOS, E. N. et al. Effect of simvastatin/ezetimibe 10/10 mg versus simvastatin 40 mg on serum vitamin D levels. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v.18, p.229-33, 2013.

LIMA, L. M. et al. Proteína C-reativa ultra-sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **J Bras Patol Med Lab.** v. 43, p. 83-86, 2007.

LINARELLI, M. C. B.; POTT, J. R. H. Estatinas: uma revisão sobre os aspectos vasculares. **Rev Ciên Med.** V.17, p.43-52, 2008.

LWIN-MM-KHIN. et al. Risk factors for hypertension among rural Thais. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health.** v.42, p.208-17, 2011.

MEHRZADI, S. et al. Melatonin synergistically enhances protective effect of atorvastatin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rat kidney. **Can J Physiol Pharmacol.** v. 94, p.265-71, 2016.

MELO, M.G. et al. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. **Toxicol In Vitro.** v.25, p.462-468, 2011.

MESRI, A. N. et al. A double-blind, placebo-controlled trial related to the effects of melatonin on oxidative stress and inflammatory parameters of obese women. **Horm Metab Res.** v.47, p.504-8, 2015.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem.** v.247, p.3170-3175, 1972.

NAJI, L.. et al. Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life Sci.** v.74, n. 18, p. 2227-2236, 2004.

NDUHIRABANDI, F.; DU TOIT, E. F.; LOCHNER, A. Melatonin and the metabolic syndrome: A tool for effective therapy in obesity-associated abnormalities? **Acta Physiol.** V.205, p.209-23, 2012.

OGETURK, M. et al. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. **Toxicol Ind Health.** v.24, p.201–208, 2008.

PADULLA, A. S. T. et al. Effects of statin and aerobic physical exercise association in the cardiomyocytes of the rat: morphometric study. **Int J Morphol.** v. 27, p. 83-88, 2009.

PANDI-PERUMAL, S. R. et al. Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. **Neurotox Res.** v.23, p.267-300, 2013.

PAULSEN, P. Statins and inflammation: an update. **Curr. Opin. Cardiol.** v. 23, p. 243–275, 2010.

PESCHKE, E.; BAHR, I.; MUHLBAUER, E. Melatonin and pancreatic islets: interrelationships between melatonin, insulin and glucagon. **Int J Mol Sci.**v.14, p.6981–7015, 2013.

PETYAEV, I. M. Improvement of hepatic bioavailability as a new step for the future of statin. **Arch. Med. Sci.** v. 11, p. 406–410, 2015.

PRUNET-MARCASSUS, B. et al. Evidence for a direct effect of melatonin on mitochondrial genome expression of Siberian hamster brown adipocytes. **J Pineal Res.** v.30, p.108–15, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Ann. Clin. Biochem.** v. 95, p. 351–358, 1979.

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

REITER, R. J. et al. Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor independent actions. **Adv Med Sci.** v.52, p.11-28, 2007.

RIOS-LUGO, M. J. et al. Melatonin effects on adipopectin leptin, insulin, glucose, triglycerides, and cholesterol in normal and high fed rats. **J Pineal Res.** v.49, p.342-8, 2010.

SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T.; BLASK, D. E. Melatonin inhibits fatty acid transport in inguinal fat pads of hepatoma 7288CTC-bearing and normal Buffalo rats via receptor-mediated signal transduction. **Life Sci.** v.68, p.2835–44, 2001.

SCHINONI, M. I.; PARANÁ, R. Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases]. cta **Gastroenterol Latinoam.** v.36, p. 211-7, 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Ann. Rev. Biochem.** v. 25, p.192-195, 1968.

ŞENER, G.. et al. M. Melatonin reduces cholesterol accumulation and prooxidant state induced by high cholesterol diet in the plasma, the liver and probably in the aorta of C57BL/6J mice. **J Pineal Res.** v.6, p.212–6, 2004.

SEO, H. S. The role and clinical significance of high-sensitivity C-reactive protein in cardiovascular disease. **Korean Circ. J.** v. 42, p.151–153, 2012.

SHE, M. et al. A novel melatonin agonist, inhibits weight gain and improves insulin sensitivity in high-fat/high-sucrose-fed rats. **Pharmacol Res.** v.59: 248-53, 2009.

SHILIAN, H. U. et al. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. **Eur J Pharmacol.** v. 616, p.287–292, 2009.

SHUKLA, V.; MISHRA, S. K.; PANT, H. C. Oxidative stress in neurodegeneration. **Adv Pharmacol Sci.** v.2011, p.57-70, 2011.

SHARMA, R. D. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. **Atherosclerosis.** v.33, p.371-375, 1979.

SIGALA, F. et al. Therapeutic value of melatonin in an experimental model of liver injury and regeneration. **J Pineal Res.** v.40, p.270–279, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretrizes brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. **Arq Bras Cardiol.** v. 88, p. 2-19, 2007.

SRINIVASAN, V. et al.. Metabolic syndrome, its pathophysiology and the role of melatonin. **Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.** v.7, p.11–25, 2013.

SRIVASTAVA, S. et al.. Antidyslipidemic and antioxidant effects of novel Lupeol-derived chalcones. **Lipids.** v.48, p.1017-27, 2013.

STEFFEL, J.; LUSCHER, T. F. Predicting the development of atherosclerosis. **Circulation.** v.119, p.919-921, 2009.

TAMURA, H. et al. Long term melatonin treatment delays ovarian aging. **J Pineal Res.** 2017.

TAN, D. X. et al.; REITER, R. J. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. **J Pineal Res.** v.61, p.27-40, 2016.

TANG, S. T. et al. Melatonin Attenuates Aortic Endothelial Permeability and Arteriosclerosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats: Possible Role of MLCK- and MLCP-Dependent MLC Phosphorylation. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** v.20, p.82-92, 2016.

VENEROSO, C. et al. Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. **J Pineal Res.** v. 47, p.184–191, 2009.

VOLP, A. C. et al. INFLAMMATION biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.52, p.537-49, 2008.

WANG F. et al. Lovastatin upregulates microRNA-29b to reduce oxidative stress in rats with multiple cardiovascular risk factors. **Oncotarget.** 2017.

WON S. J. et al. HMG-CoA reductase inhibitor improves endothelial dysfunction in spontaneous hypertensive rats via down-regulation of caveolin-1 and activation of endothelial nitric oxide synthase. **J. Korean Med. Sci.** v.25, p.16–23, 2010.

YAMADA, N. FROM THE POINT OF VIEW OF HYPOTHESIS TO EVIDENCE BASED MEDICINE. **Atherosclerosis** v. 69, P. 7-12, 2011.

ZHANG, Y. et al. Melatonin protects against arsenic trioxide-induced liver injury by the upregulation of Nrf2 expression through the activation of PI3K/AKT pathway. **Oncotarget**. 2017.

6. Tabelas, figuras e gráficos

Tabela 1: Valores dos níveis bioquímicos da função hepática nos animais dos grupos experimentais antes da indução da hiperlipidemia.

Grupos	GC	GI	GIS	GIMs	GIM	GIMsS	GIMS
Colesterol Total(mg/dl)	95,00 ± 1,00	91,00 ± 9,64c	90,33 ± 9,29a	90,67 ± 4,9c	85,67 ± 8,32c	88,67 ± 6,11c	98,67 ± 6,50c
HDL (mg/dL)	52,67 ± 2,40	51,26 ± 1,71c	51,31 ± 2,28a	53,91 ± 2,0c	45,34 ± 4,56c	51,88 ± 3,01c	47,35 ± 8,51c
VLDL (mg/dL)	31,33 ± 1,19	28,36 ± 2,33c	27,43 ± 4,18a	32,03 ± 2,9c	29,60 ± 3,54c	27,50 ± 3,91c	31,60 ± 1,06c
LDL (mg/dL)	25,10 ± 1,94	25,23 ± 0,99c	27,80 ± 2,15a	27,76 ± 1,0c	26,86 ± 2,62c	24,66 ± 2,84c	23,79 ± 4,74c
Triglicerídeos (mg/dL)	135,00 ± 10,0	136,06 ± 9,12	137,33 ± 7,88a	133,40 ± 8,9c	132,66 ± 11,2c	133,57 ± 5,98	134,00 ± 9,54
TGO (U/mL)	48,00 ± 5,09	46,66 ± 3,72c	47,30 ± 2,38a	51,33 ± 2,9c	49,13 ± 4,05c	50,40 ± 3,79c	51,18 ± 2,54c
TGP (U/mL)	69,33 ± 6,73	62,66 ± 3,30c	64,01 ± 5,27a	67,00 ± 7,9c	60,00 ± 5,82c	64,60 ± 4,32c	61,33 ± 3,65c

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle, GI: induzido à hiperlipidemia, GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina, GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução, GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução, GIMsS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução, GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução

Tabela 2: Valores dos níveis bioquímicos da função hepática nos animais dos grupos experimentais após tratamento.

Grupos	GC	GI	GIS	GIMs	GIM	GIMsS	GIMS
Colesterol Total(mg/dl)	96,00 ± 5,11	124,66 ± 2,60c	88,61 ± 4,45b	90,30 ± 3,77b	80,00 ± 4,71	66,33 ± 2,62c	68,40 ± 3,90c
HDL (mg/dL)	43,34 ± 3,91	30,26 ± 3,77	49,79 ± 5,40b	46,08 ± 2,78c	54,61 ± 4,11	63,95 ± 2,82c	64,97 ± 1,99c
VLDL (mg/dL)	27,66 ± 2,22	49,06 ± 3,66	21,53 ± 4,05b	28,65 ± 1,96b	20,13 ± 5,12b	14,60 ± 2,61c	14,26 ± 2,39c
LDL (mg/dL)	27,32 ± 3,13	54,67 ± 1,93	26,68 ± 1,52b	30,05 ± 4,83b	21,26 ± 4,65	10,79 ± 2,04c	11,43 ± 1,33c
Triglicerídeos (mg/dL)	121,70 ± 10,5	172,00 ± 12,4	127,14 ± 8,17	126,50 ± 9,26	103,00 ± 5,8	82,06 ± 6,18c	83,33 ± 4,59c
TGO (U/mL)	45,33 ± 3,19	117,70 ± 4,4c	40,67 ± 2,38b	44,67 ± 5,76b	42,39 ± 2,03	40,33 ± 3,14b	38,00 ± 4,49b
TGP (U/mL)	66,18 ± 4,03	176,00 ± 6,5c	63,34 ± 1,65b	61,09 ± 2,35b	59,00 ± 3,81	60,97 ± 3,57b	61,23 ± 2,44b

Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle, GI: induzido à hiperlipidemia, GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina, GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução, GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução, GIMsS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução, GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

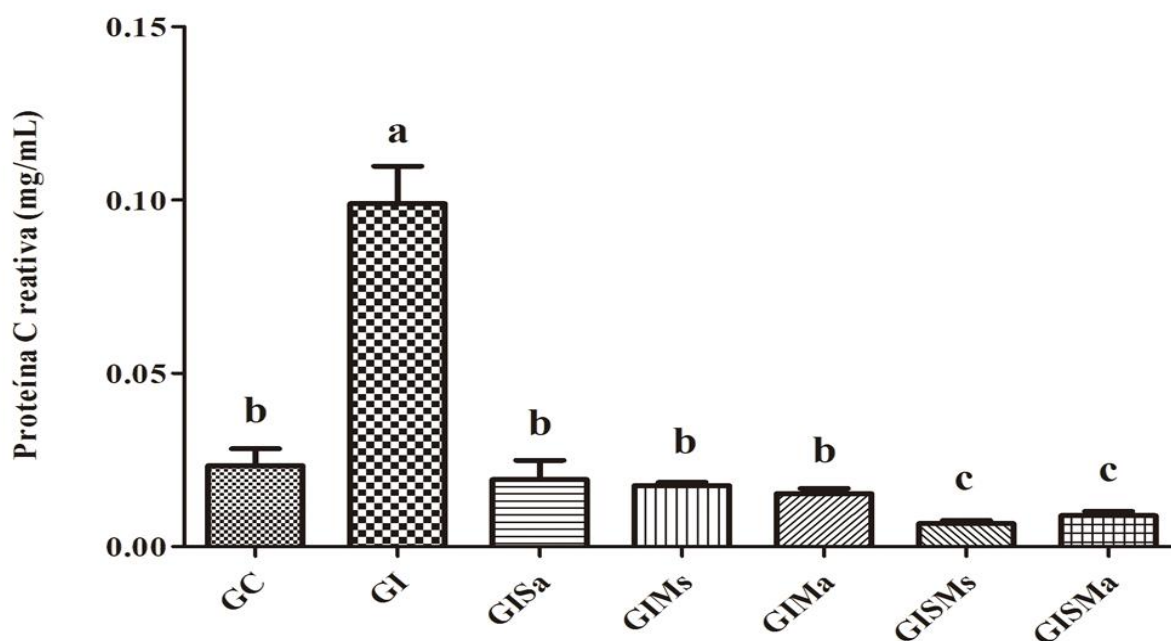


Figura 1. Gráfico dos valores de proteína C reativa (mg/mL) de proteína dos animais nos diferentes grupos experimentais (GI-GVII). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

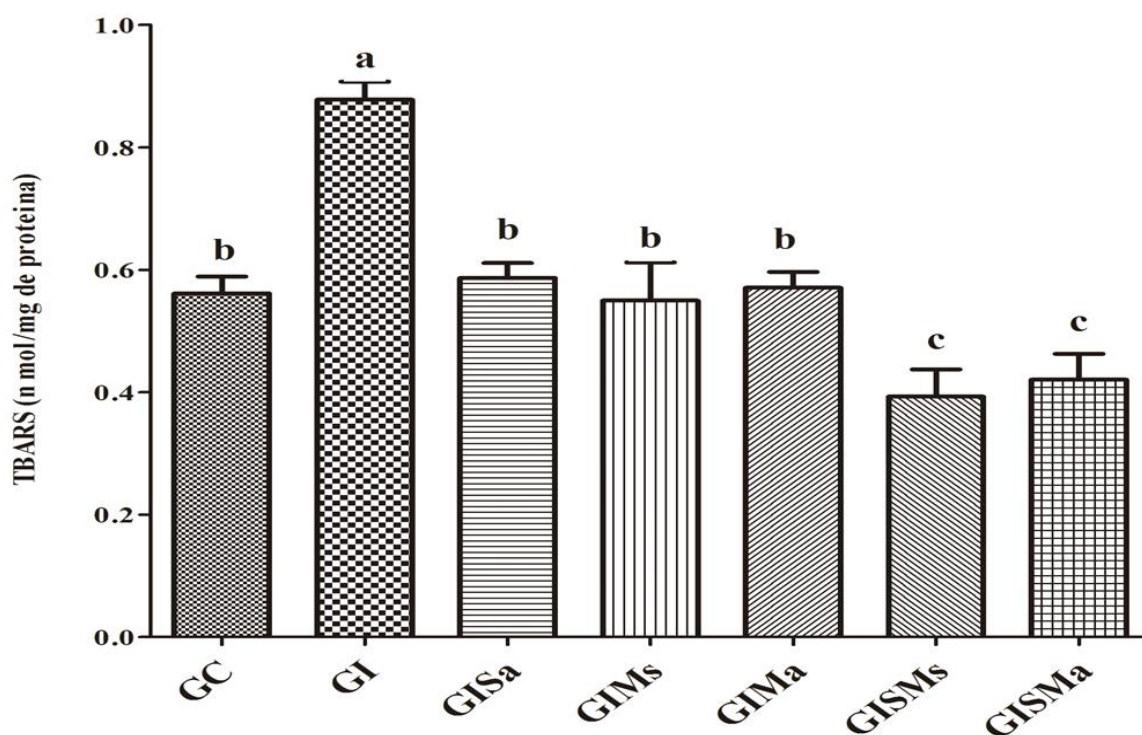


Figura 2. Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais GI-GVII) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

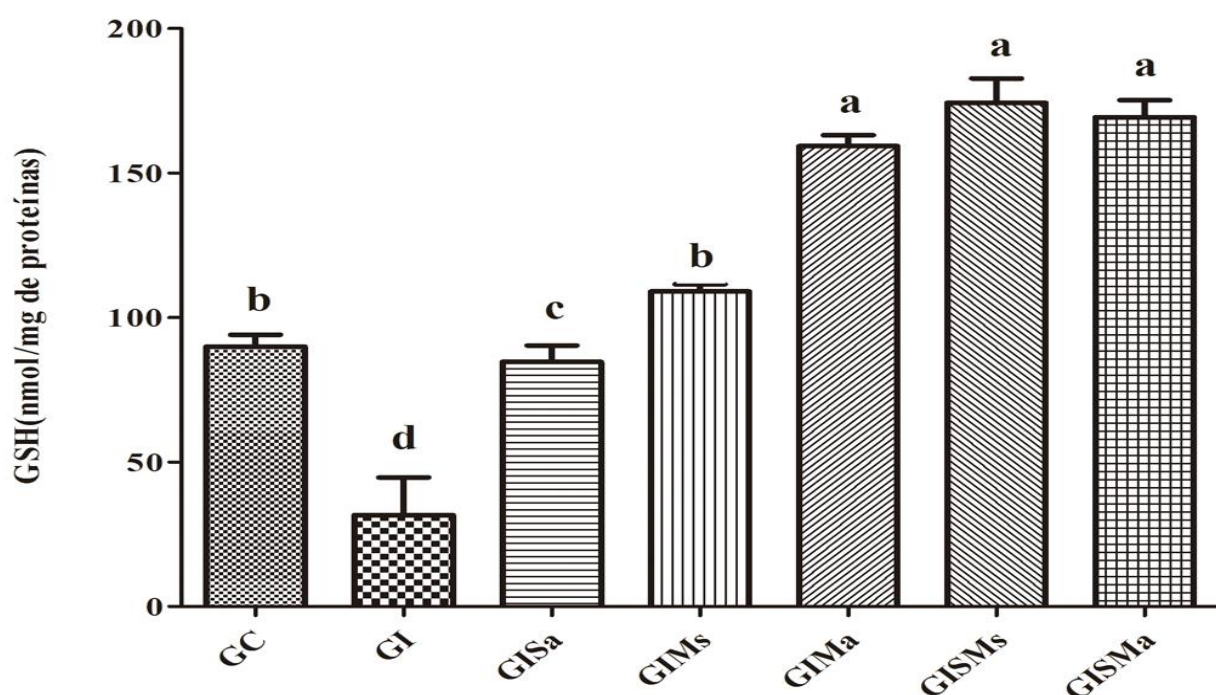


Figura 3. Avaliação dos níveis de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais GI-GVII) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

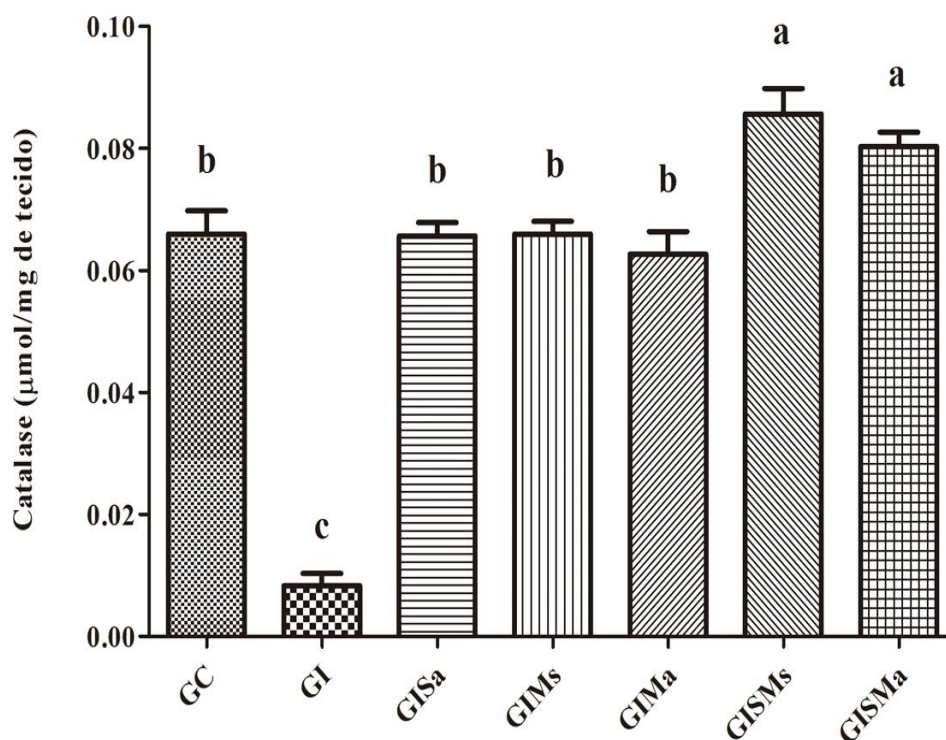


Figura 4. Avaliação da enzima antioxidante catalase ($\mu\text{mol/mg}$ de tecido) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais GI-GVII) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle, GI: induzido à hiperlipidemia, GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina, GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução, GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução, GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução, GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

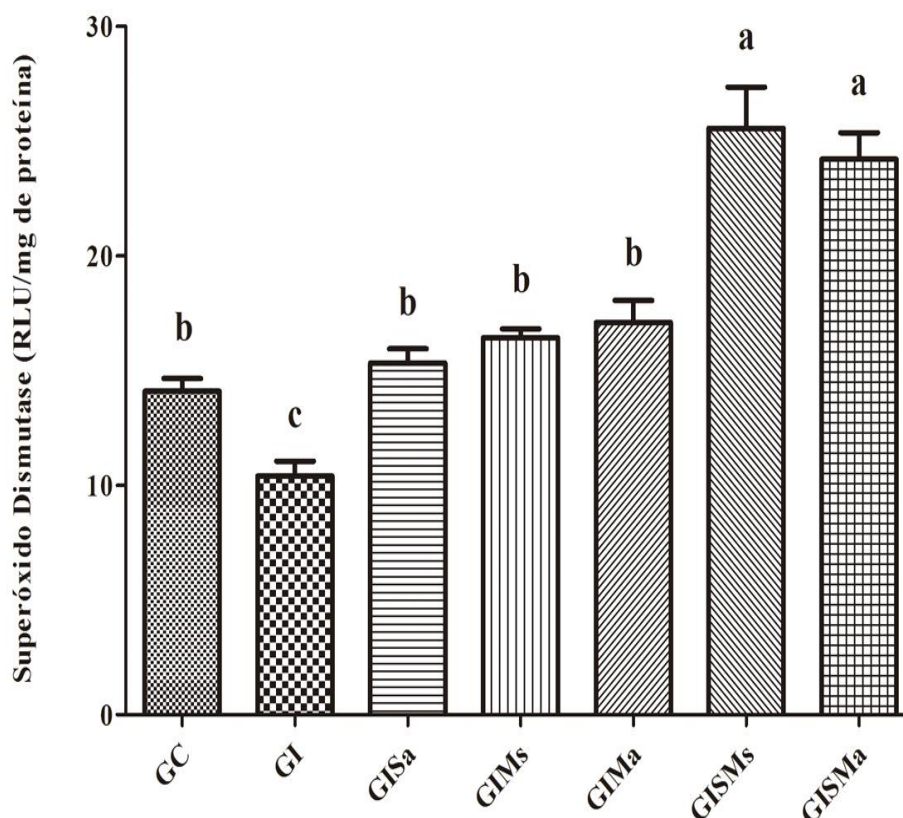


Figura 5. Avaliação da enzima antioxidante superóxido dismutase (RLU//mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais GI-GVII) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle, GI: induzido à hiperlipidemia, GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina, GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução, GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução, GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução, GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

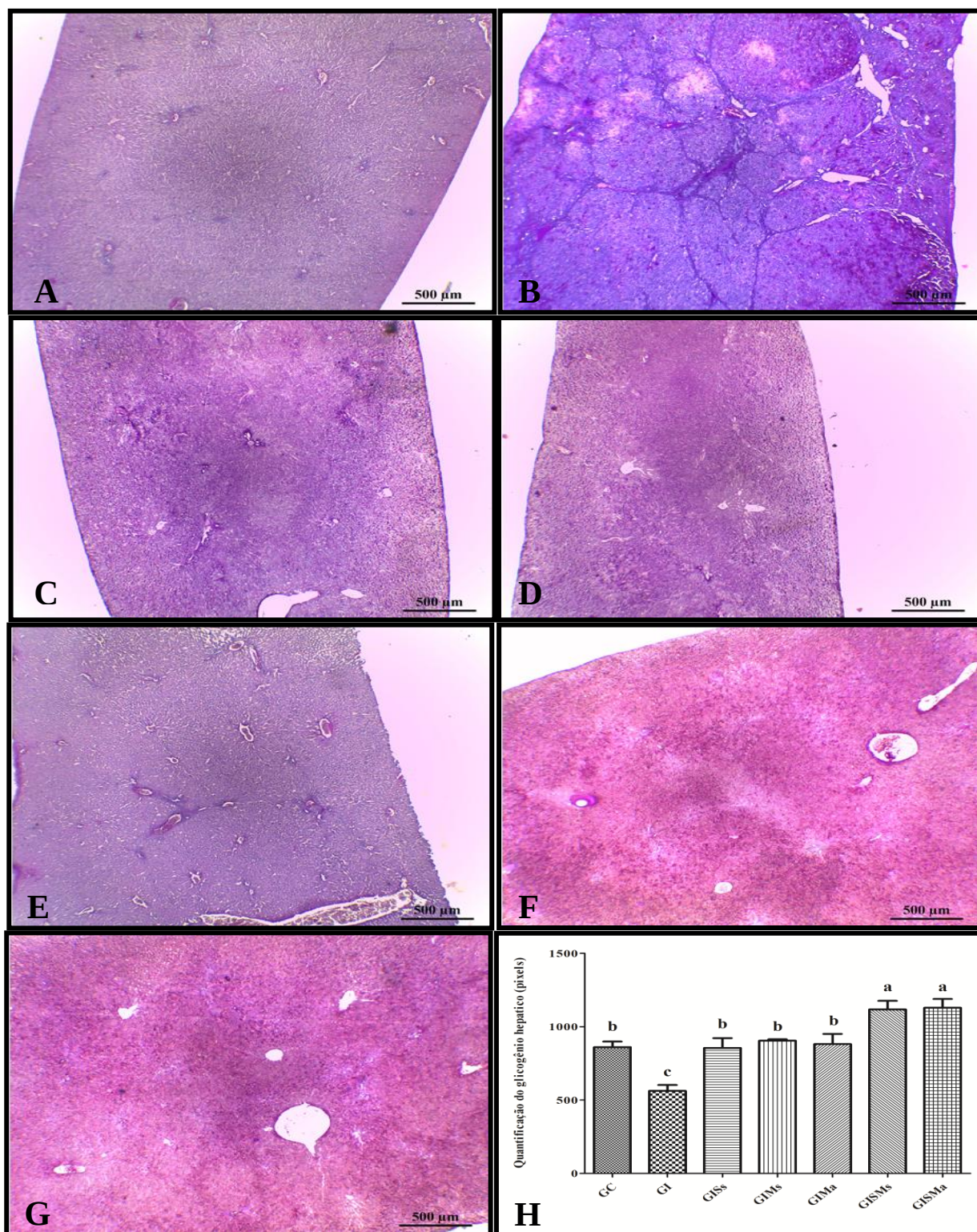


Figura 6: Fotomicrografia de fígado evidenciando glicogênio hepático corado pelo Ácido Periódico de Schiff. A: Grupo controle, B: Grupo induzido à aterosclerose, C: Grupo induzido à aterosclerose e tratado com sinvastatina, D: Grupo induzido à aterosclerose e tratada com melatonina simultaneamente à indução, E: Grupo induzido à aterosclerose e tratada com melatonina após indução, F Grupo induzido à aterosclerose e tratada com melatonina e

sinvastatina simultaneamente à indução, G: Grupo induzido à aterosclerose e tratada com melatonina e sinvastatina após à indução, H: Quantificação de glicogênio hepático. Coloração Ácido Periódico de Schiff. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de ANOVA seguido pelo pos hoc de Tukey ($P < 0,05$).

Capítulo III

Melatonina associada à sinvastatina protege a histofisiologia renal de ratos submetidos à hiperlipidemia

Laíse de Souza Elias¹, Carolline Guimarães D'Assunção¹, Cíntia Giselle Martins Ferreira¹,
Leucio Duarte Vieira Filho², Valéria Wanderley Teixeira¹, Álvaro Águiar Coelho Teixeira¹

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

² *Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica e Fisiologia, Recife, Brasil*

*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos- Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389

E-mail: alvaro@dmfa.ufrpe.br

Resumo

Foi avaliada a associação da melatonina e sinvastatina na proteção do tecido renal em ratos submetidos à hiperlipidemia, através dos parâmetros bioquímicos: avaliação da proteinúria, estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e degradação da matriz. Utilizou-se 35 ratos machos com 150 dias de idade, que foram divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução à hiperlipidemia; GI: ratos induzidos à hiperlipidemia pelo Triton WR 13339 e tratado com placebo; GIS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com sinvastatina; GIMs: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina simultaneamente; GIMsS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina e sinvastatina simultaneamente; GIM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina; GIMS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina e sinvastatina. A hiperlipidemia foi induzida pela administração intraperitoneal de Triton WR 1339 (400 mg/kg), a sinvastatina (40mg/kg) foi administrada via subcutânea e a melatonina (10mg/kg) administrada na água de beber dos animais. Foi realizada a análise bioquímica dos seguintes parâmetros: creatinina e ureia, o estresse oxidativo hepático, através da peroxidação lipídica (TBARS) e níveis de glutathione reduzida, imonohistoquímica para IL-6 e TNF- α , além da histoquímica renal e expressão das MMP-2 e MMP-9. Os resultados mostraram que a melatonina e sinvastatina isoladas ou associadas foram eficientes na diminuição da proteinúria, com resultados mais significativos na diminuição da ureia no grupo GIMsS. A análise do estresse oxidativo, demonstrou uma

redução do nível de TBARS e aumento do nível do GSH nos grupos melatonina e/ou sinvastatina quando comparado ao GI. Com relação à imunomarcagem para IL-6 e TNF- α , nossos resultados demonstram que o tratamento com MEL isolada ou administrada simultaneamente com a sinvastatina apresentou efeitos mais expressivos na redução desses marcadores inflamatórios. Por fim, a melatonina administrada de forma isolada ou combinada com a sinvastatina provocou um aumento na expressão das MMP-2 e MMP-9, consequentemente uma redução nos níveis de colágeno. Diante dos nossos resultados, afirma-se que a combinação de melatonina e sinvastatina foi eficiente na proteção contra a injúria renal provocada pela hiperlipidemia, podendo atuar, como uma nova terapia no tratamento clínico das DCV's.

Palavras-chave: hiperlipidemia, melatonina, sinvastatina, tyloxapol

1. Introdução

A hiperlipidemia, anormalidade lipídica caracterizada por um aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c), triglicerídeos ou diminuição das lipoproteínas de alta densidade (HDL-c) no soro, isoladamente ou associadas (SOUZA et al, 2013), é um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, as quais são responsáveis por cerca de 30% das mortes em todo o mundo (CAI et al., 2011).

Os níveis de lipídios aumentados na circulação sanguínea podem desencadear um aumento do estresse oxidativo em vários órgãos, como fígado, coração e rins, devido à elevação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DUARTE et al., 2009). Sabe-se que, as células glomerulares, tubulares e os macrófagos são potenciais geradores destas EROs no tecido renal (GALLE, 2001; SCOTT, 2008). Dessa forma, a hiperlipidemia está associada ao aumento de radicais livres em modelos humanos e animais (EL-NEWARY et al., 2016) e as EROs desempenham um importante papel no processo de inflamação crônica (DUARTE et al., 2009), consequentemente, provocando lesões em órgãos sólidos, como fígado e os rins.

Segundo Meilhac et al (2001), os lipídeos oxidados também exibem efeitos pró-aterogênicos, devido que a LDLox é citotóxica para as células endoteliais, promovendo a expressão de citocinas e a proliferação celular, desencadeando assim, uma cascata de respostas inflamatórias (SMITH, 2001). Como resultado, um grande número de citocinas pró-inflamatórias (como a IL-6, TNF- α e TGF- β), fatores e moléculas de adesão são secretados,

enquanto citocinas anti-inflamatórias são suprimidas (KASSIN et al., 2010). Na última década, além da avaliação do perfil lipídico e moléculas inflamatórias, as metaloproteinases (MMP) têm sido estudados na patogênese da hiperlipidemia e eventos cardiovasculares devido a seu importante papel na diferenciação, proliferação e migração celular, bem como no remodelamento vascular (SILVA & MORESCO, 2011). As MMP são endoproteases zinco-dependentes, com atividade collagenase e/ou gelatinase, que exercem importante papel na clivagem de componentes de matriz extracelular (BENJAMIN & KHALIL, 2012). Dentre as inúmeras MMP, as MMP-2 e MMP-9 são as principais gelatinases envolvidas na formação e desestabilização das placas lipídicas (KETELHUTH & BÄCK, 2011).

As estatinas são os fármacos mais potentes e eficazes na redução dos níveis plasmáticos, pois atuam como inibidores competitivos da hidroximetilglutaril-Coenzima A redutase (HMGCR). A inibição dessa enzima reduz o conteúdo intracelular de colesterol e, como consequência, há aumento do número de receptores de LDL-C nos hepatócitos e internalização do colesterol circulante (CAMPO; CARVALHO, 2007). Dentro do grupo das estatinas, a sinvastatina é uma estatina que se destaca. Esta é amplamente utilizada na clínica cardiológica, pois apresenta baixo custo e é fornecida com prescrição médica pelas Unidades Básicas de Saúde pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (GRAESER et al., 2008). A sinvastatina, através do seu metabólito ativo, o beta-hidroxiácido, ao inibir competitivamente a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA em mevalonato, reduz o LDL, o VLDL, o colesterol plasmático total, e os triglicerídeos plasmáticos (SCHULZ et al., 2006), além de aumentar moderadamente o HDL (SILVA et al., 2008).

Levando-se em consideração que o aumento dos níveis séricos de lipídios, principalmente o LDL, que por processos oxidativos iniciados por radicais livres, se converte em moléculas potencialmente aterogênicas (MEERTENS et al., 2008), a modificação oxidativa da LDL é considerada um evento chave no desenvolvimento e progressão da placa lipídica, que podem promover efeitos em diferentes órgãos (BOTELHO et al., 2012; SILVA; VEIGA; RAMALHO, 2007), pois estudos indicam que a hiperlipidemia podem potencialmente prejudicar a função renal ao promover a proliferação de células mesangiais e citocinas pró-inflamatórias (WAHBA; MAK, 2007). Diante disso, tem-se buscado estratégias terapêuticas que visem além do efeito hipolipemiante, o efeito antioxidante das substâncias, cujo objetivo é diminuir a produção das EROS.

A melatonina (MEL), uma indolamina produzida durante a fase de escuro pela glândula pineal, é considerada um dos mais poderosos agentes antioxidantes naturais (TAN et al., 2002). Diversas células e órgãos apresentam receptores para a melatonina, como os MT1,

encontrados nos rins, fígado, retina, ovários, e também em células do sistema imune, como células B, T CD4+, e T CD8+, além do timo e baço (CARILLO-VICO et al., 2005). Dentre os produtos disponíveis com evidências de ação antioxidante, a melatonina apresenta propriedades promissoras na proteção renal durante o período de isquemia, onde sua administração foi capaz de reverter lesões oriundas do estresse oxidativo e fibrose, no parênquima e estroma deste órgão (SUTKEN et al., 2007), além disso, a MEL apresenta a capacidade de reduzir a inflamação e proteger o citoesqueleto celular contra a apoptose (KURCER et al., 2007; ERSOZ et al., 2009; LI et al., 2009; VINAGRE, 2011).

Assim, a presente pesquisa avaliou se a associação da melatonina a sinvastatina em ratos submetidos à hiperlipidemia pode prevenir danos na histofisiologia renal, atenuando ou prevenindo alterações bioquímicas, marcadores inflamatórios e estresse oxidativo.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 35 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) com 150 dias de idade, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para isto, este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética. Esses animais foram mantidos em gaiolas, com alimentação e água ad libitum, temperatura de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro. Os animais foram pesados, submetidos à avaliação bioquímica para verificação dos parâmetros bioquímicos (Tabela 1), em seguida, divididos aleatoriamente em sete grupos experimentais: GC: ratas sem indução à hiperlipidemia; GI: ratos induzidos à hiperlipidemia pelo Triton WR 1339 e tratado com placebo; GIS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com sinvastatina; GIMs: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina simultaneamente; GIMsS: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados com melatonina e sinvastatina simultaneamente; GIM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina; GISM: ratos induzidos à hiperlipidemia e tratados após com melatonina e sinvastatina.

2.1. Indução da hiperlipidemia

Para induzir a hiperlipidemia foi administrado durante vinte dias, por via intraperitoneal, Triton WR 1339, também conhecido como tyloxapol (Sigma Aldrich), um detergente não

aniônico de estrutura polimérica, na dose de 400mg/Kg de peso corporal, dissolvido em NaCl à 0,9% de acordo com o protocolo descrito por Jingjing e Xiangrong (2007). Esta substância tem sido utilizada em trabalhos experimentais por ser capaz de causar hiperlipidemia em animais (SHARMA, 1979). Para verificação da hiperlipidemia, após o terceiro dia de indução foi realizado análises bioquímicas, para tal, utilizou-se kits da Labtest®, seguindo os catálogos especificados: colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos. Os animais não induzidos à hiperlipidemia (GC) receberam da mesma forma, doses equivalentes de solução salina.

2.2. Administração da sinvastatina

Os animais dos grupos GIII, GVI e GVII foram tratados com 40 mg/Kg de sinvastatina por via subcutânea, segundo metodologia de Padulla et al., (2009). Essa dose tem sido utilizada em diferentes estudos experimentais (LIBEROPOULOS et al., 2013; FOUCHER et al., 2015; HERNANDEZ-MIJARES et al., 2016).

2.3. Administração da melatonina

A melatonina (SIGMA Chemical Co St Louis, Mo) foi administrada via oral (VO), para isso, 10 mg/Kg de melatonina foi dissolvida em 200 microlitros de álcool (OZGUNER et al., 2006). Essa dose tem sido utilizada em diferentes estudos experimentais (BUTUN et al., 2013; TANG et al., 2016). Em seguida, no horário das sete horas da manhã, esta solução foi diluída na água de beber dos animais, vale salientar que as garrafas foram revestidas por papel alumínio para proteger o conteúdo da luminosidade, segundo metodologia de Agilet et al., 2013.

2.4. Análise bioquímica

As amostras de sangue foram coletadas nos períodos antes da indução da hiperlipidemia para confirmação da indução e após o tratamento. Para análise antes do período da indução e confirmação da indução, os ratos foram mobilizados por contensor mecânico e o sangue coletado por punção caudal lateral com o uso de cateter (24G) (PEREIRA, 2001) Já para a análise após indução e seu respectivo tratamento, o sangue foi coletado por punção cardíaca. O material foi rapidamente centrifugado, o sobrenadante acondicionado em Eppendorf e mantido em freezer a -20°C até o momento das dosagens. Para tal, utilizou-se kits da Labtest®,

segundo os catálogos especificados: ureia e creatinina. As amostras foram analisadas em triplicata em um analisador bioquímico (BioPlus 200f).

2.5. Marcadores do estresse oxidativo renal (peroxidação lipídica e glutathiona reduzida)

A peroxidação lipídica foi estimada através da medida dos níveis de substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) (OHKAWA et al., 1979), enquanto a glutathiona reduzida foi determinada através da mensuração de grupamentos sulfídrilas não proteicos (SEDLAK & LINDSAY, 1968). Para isso, fragmentos do fígado foram macerados em KCl, 1, 15% numa proporção de 10 ml/1g até completa homogeneização do material coletado. O homogenato foi transferido para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 2mL de reagente (0,375% ácido tiobarbitúrico e 75% ácido tricloroacético) para cada mL da mistura. Os tubos em duplicata foram lacrados e aquecidos em banho maria (100 °C) durante 15 minutos. O sobrenadante foi separado e a absorvância medida a 535 nm (BUEGE & AUST, 1978).

2.6. Imunohistoquímica do rim (IL6 e TNF- α)

Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e reidratadas em xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase endógena foi antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora. Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp2.0 para a quantificação por meio de Histograma RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de luminescência onde os tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255, representa o branco absoluto (maior luminescência) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

2.7 Histoquímica do rim

Para avaliar o teor de fibras colágenas, fragmentos renais foram dissecados e fixados em solução contendo formalina a 10% tamponada por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à desidratação em soluções de concentração crescente de etanol, dois banhos de tolueno e incluídos em parafina. Foram então realizados cortes histológicos com o auxílio de um micrótomo (LEICA RM 2125RT) para confecção das lâminas histológicas. As lâminas foram pré-tratadas com xileno para remoção de parafina e de solução Sirius Red em ácido pícrico saturado durante 2 horas. Após esse processo, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, clareadas em xileno, e montadas em bálsamo do Canadá sintético. As avaliações foram realizadas com o auxílio de um Microscópio Leica DM500 acoplado com câmera Leica ICC50H e de software LAS EZ 4.3. Cinco imagens, com a mesma ampliação, foram analisadas para a quantificação do colágeno por meio do software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Program, as plataformas UNIX).

2.8 Expressão e atividade da MMP-2 e MMP-9

Os marcadores foram detectados nas membranas e imunoprecipitados, respectivamente, utilizando anticorpos específicos. As proteínas da amostra foram separadas utilizando SDS-PAGE (10%) e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). A ligação não específica foi impedida por incubação das membranas com 5% de leite sem gordura diluído em TBS (pH 7,6) durante 1 h. As membranas foram sondadas com os anticorpos primários correspondentes (diluição 1:500) durante 1 h à temperatura ambiente durante agitação suave, lavadas três vezes com TBS contendo Tween 20 a 0,1%, expostas ao anticorpo secundário, lavadas e visualizadas utilizando ECL TM. Após a revelação, a membrana foi digitalizada e as bandas analisadas pelo programa ImageJ para determinar a densitometria óptica de cada microponto de tonalidade escura na foto.

2.9 Análise Estatística

A análise estatística das análises bioquímicas, marcadores do estresse hepático, marcadores inflamatórios, quantificação do colágeno e metaloproteínase foram realizadas por meio do

método não-paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias foram comparadas pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, a 95% de significância.

3. Resultados e discussão

De acordo com Lopez-Giacoman & Madero (2015), a creatinina e ureia são utilizados como biomarcadores da função renal, de modo que, a elevação de seus níveis na corrente sanguínea é indicativo de lesão renal aguda (WAIKAR & BONVENTRE, 2009). No presente estudo, foi observado um dos níveis de creatinina no grupo GI, porém, uma redução nos grupos tratados com melatonina e/ou sinvastatina, sendo estes similares ao grupo GC. Em relação aos níveis de ureia notou-se uma elevação dos níveis no grupo GI, porém, nos grupos tratados com melatonina e sinvastatina foi observado níveis equivalentes ao grupo controle, além disso, quando ocorreu a associação melatonina/sinvastatina, esses níveis ainda foram menores que o GC. Nossos resultados estão de acordo com os de Kurceret al., 2007, este afirma que ratos submetidos a lesão renal e tratados com melatonina apresentou níveis diminuídos ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo, da mesma forma, Chang et al. (2016), em modelo animal de isquemia-reperfusão, constatou a ação da melatonina na redução dos níveis de creatinina e ureia. Semelhante a estes resultados da melatonina, foi demonstrado que ratos submetidos a glomerulonefrite e tratados com sinvastatina apresentaram uma diminuição da proteinúria (CHRISTENSEN et al., 2006), este dado também foi descrito por Al-Otaibi et al. (2012), que demonstrou que o tratamento com sinvastatina atenuou o aumento da creatinina, ureia e alterações patológicas em ratos com nefropatia, sugerindo seu efeito nefroprotetor. Com base em nossos resultados, podemos presumir que a associação melatonina/sinvastatina pode ser uma terapia eficiente em lesões renais (Figura 1 e 2).

A análise tecidual dos níveis de TBARS no tecido renal após indução à hiperlipidemia revelaram valores elevados quando comparados ao grupo controle. Já entre os grupos tratados com melatonina e/ou sinvastatina, concomitantemente ou após a indução, evidenciou valores semelhantes ao grupo controle (GI), demonstrando assim, o papel da melatonina em atenuar a peroxidação lipídica. (Figura 3). A análise tecidual dos níveis de GSH nos grupos tratados com sinvastatina e /ou melatonina foram superiores aos animais do grupo GI e similares ao grupo controle (Figura 4). Tais resultados demonstram a ação antioxidante da melatonina e sinvastatina, e a potencialização desse efeito quando essas substâncias estão associadas.

Concordando com nossos resultados, Onket al. (2016) verificou que a melatonina (20mg/kg) foi eficiente na diminuição dos níveis de TBARS e aumento dos níveis de GSH em

ratos com nefropatia diabética. Leibowitz et al. (2016), testando o efeito da melatonina em modelo experimental de hipertensão, constatou efeitos positivos contra o estresse oxidativo, através da diminuição de ânions superóxido, em decorrência da menor expressão dos genes NOX4 e p67(phox) que estão relacionados ao estresse oxidativo. Além disso, a MEL também foi capaz de aumentar a expressão da via Keap1-Nrf2-ARE, e como consequência, desencadear o aumento das enzimas antioxidantes (MANCHESTER et al., 2015).

A sinvastatina na dose de 40mg/kg foi eficiente na redução da peroxidação lipídica, na elevação do nível de GSH, além de reverter danos histológicos em ratos com lesão renal aguda induzida por cromo (ZAHRA et al., 2017). Adicionalmente, Yao et al. (2015) observaram que a sinvastatina atenua o nível de malonaldeído e protege o coração contra lesão miocárdica causada por isquemia miocárdica aguda e Mohammadi et al. (2015) descreve que o pré-tratamento de ratos com sinvastatina causou efeitos protetores no tecido renal em ratos submetidos ao chumbo.

Os resultados observados nos grupos GIMs e GIMs são justificados pelo fato de que ambas as substâncias demonstram atividade antioxidante, potencializando assim, a diminuição dos marcadores do estresse oxidativo. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Mehrzadi et al. (2016), que ao testar a associação da melatonina com a atorvastatina, verificou uma maior expressão de GSH, superóxido desmutase e catalase, além da redução da peroxidação lipídica renal em ratos com nefropatotoxicidade induzida por gentamicina, quando comparada com a administração isolada da melatonina e/ou atorvastatina. Em estudo, para analisar o efeito da associação melatonina/atorvastatina em células endoteliais da veia umbilical humana cultivadas em lipopolissacarídeo humano (LPS), percebeu-se que essa associação induziu uma maior expressão da óxido nítrico sintetase (eNOS) e redução da peroxidação lipídica e da IL-6 (DAYOUB et al., 2011).

A imunomarcagem para IL-6 nos rins demonstrou que os ratos do grupo GI apresentaram um aumento nos níveis dessa citocina, porém, nos grupos GIS, GIM e GIMs foi observado valores semelhantes ao grupo controle, além disso, nos grupos GIMs e GIMs observou-se uma redução ainda mais significativa dos níveis de IL-6 (Figura 5). A quantificação de TNF- α neste mesmo órgão apresentou padrão de marcação semelhante a IL-6, onde foi promovido um aumento significativo dessa citocina no grupo GI, quando comparado com os demais grupos experimentais, além disto, observa-se também que a administração exógena da melatonina, quando aplicada simultaneamente de forma isolada ou combinada com a sinvastatina, reduz de forma mais significativa o nível desta citocina (Figura 6). Esses resultados demonstram que a melatonina e sinvastatina apresentam um efeito nefroprotetor, porém quando associadas,

potencializam a diminuição dos níveis de IL-6 e TNF- α , minimizando assim, o processo inflamatório.

Em relação a MEL, vários estudos descrevem sua ação anti-inflamatória. O tratamento de ratos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com melatonina reduziu significativamente o nível de mRNA de citocinas pró-inflamatórias incluindo TNF- α , IL-1 β e IL-6 (SUN et al., 2016), restaurou os níveis deprimidos de IL-4 e IL-10 (CANO et al., 2015), além disso, melatonina provocou um *upregulated* na expressão de SIRT1 e Bcl-2 e *downregulated* na expressão de Ac-FoxO1, Ac-p53, Ac-NF- κ B e Bax, moléculas envolvidas no processo anti e pró-inflamatório, respectivamente (ZHAO et al., 2015). Zhao et al. (2014) demonstrou que a sinvastatina reduziu significativamente os níveis de TNF- α , e IL-6 em animais submetidos a isquemia-reperusão.

O mecanismo da melatonina na redução de citocinas pró-inflamatórias tem sido sugerido através da inibição da expressão do fator nuclear κ B (NF- κ B), cuja ativação pode contribuir na fisiopatologia de certos distúrbios como a diabetes mellitus, hiperlipidemia e distúrbios cardiovasculares (Mesri et al., 2015), concordando com tais achados, sujeitos em estado de privação de sono mostraram um aumento do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (IRWIN et al., 2008). Em contrapartida, em estudos realizados por Simko et al. (2009) para verificar o efeito da melatonina e da sinvastatina na pressão arterial e remodelamento ventricular esquerdo em ratos espontaneamente hipertensos, observou-se que apenas a melatonina reduziu a expressão de NF- κ B. Dessa forma, por atuarem por mecanismos distintos na inibição do processo inflamatório, a associação da melatonina à sinvastatina mostrou-se eficaz na redução dos marcadores inflamatórios, atuando, portanto, na prevenção do dano vascular em diferentes tecidos.

As MMP-2 e MMP-9 parecem exercer importante papel em órgãos, como fígado e rins, uma vez que são criticamente envolvidos na degradação dos componentes da membrana basal, como o colágeno IV e a fibronectina, tendo sua atividade regulada pelos inibidores de metaloproteinases (TIMPS). Em nosso trabalho, a quantificação do colágeno renal permitiu identificar uma maior concentração no grupo GI, com uma discreta diminuição no grupo GIS.

Os grupos GIMs, GIM, GIMsS e GIMs apresentaram uma menor quantidade de colágeno quando comparada ao grupo GI, apresentando valores similares ao grupo controle (Figura 7). A análise da expressão da MMP-2 demonstrou uma diminuição no grupo GI, quando comparado ao grupo GC e grupos tratados com MEL e sinvastatina. No entanto, os grupos melatonina e/ou sinvastatina não apresentaram diferenças significativas entre si, de modo que, os grupos GIMsS e GIMs foram significativamente diferentes apenas do grupo GI.

A expressão da MMP-9 foi maior nos grupos GIMs, GIM, GIMsS e GIMs, sendo semelhantes ao grupo GC, no entanto, o grupo GI demonstrou uma menor expressão entre os grupos experimentais. Tais resultados sugerem que o aumento da atividade tanto de MMP-2 e MMP-9 foi responsável pela redução do colágeno no tecido renal. Porém, na literatura, a ação da melatonina e sinvastatina na inibição das MMPs tem sido relatada (MISHRA et al, 2011; GANGULY et al., 2005), levantando a necessidade de mais estudos para ideias mais conclusivas.

4. Conclusão

O presente estudo indica que a terapia combinada de melatonina mais sinvastatina diminuiu a lesão renal de ratos induzidos à hiperlipidemia, através da redução de marcadores da função renal, estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e estabilização da matriz extracelular. Além disso, foi identificado que a associação da melatonina aumentou os efeitos benéficos da sinvastatina, demonstrando assim, uma possibilidade de terapia no tratamento da hiperlipidemia.

5. Referências

- AGIL, A. et al. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. **J Pineal Res.** v. 54, p.381–388, 2013.
- AL-OTAIBI, K.E. Et al. Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide. **Oxid Med Cell Longev.** v. 2012, p.831-845, 2012.
- BENJAMIN MM, KHALIL RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. **EXS.** v.103, p. 209-79, 2012.
- CAI, L. et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of dyslipidemia among adults in Beijing, China. **J. Atherosclerosis Thrombosis**, 2011.
- CAMPO, L. V.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.
- CANO, B.P. et al. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. **J Pineal Res.** v. 57, p. 280-90, 2015.
- CHANG, Y. C. et al. Enhanced protection against renal ischemia-reperfusion injury with combined melatonin and exendin-4 in a rodent model. **Exp Biol Med.** v.241, p.1588-602, 2016.

CHRISTENSEN, M. et al..Simvastatin protection against acute immune-mediated glomerulonephritis in mice.**Kidney Int.** v. 69, p. 457-63, 2006.

DAYOUB, J.C. et al. Synergism between melatonin and atorvastatin against endothelial cell damage induced by lipopolysaccharide. **J Pineal Res.** v.51, p.324-30, 2011.

DUARTE, M. M. et al.Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia.**ClinBiochem.** v.42, p.666-671, 2009.

EL-NEWARY.S.A.Et al.Hypolipidemic and antioxidant activity of the aqueous extract from the uneaten pulp of the fruit from Cordia dichotoma in healthy and hyperlipidemic Wistar albino rats.J Nat Med. 2016 Jul;70(3):539-53. doi: 10.1007/s11418-016-0973-5. Epub 2016 Mar 11.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrol Dial Transp**, v.16, n.11, p.233-235, 2001.

GANGULY K, MAITY P, REITER RJ, SWARNAKAR S. Effect of melatonin on secreted and induced matrix metalloproteinase-9 and -2 activity during prevention of indomethacin-induced gastric ulcer. J Pineal Res. v. 39, p.307-15, 2005.

GOLDENBERG, N.; GLUECK, C. Efficacy, effectiveness and real life goal attainment of statins in managing cardiovascular risk.**Vasc Health Risk Manag.**v.5, p.369-376, 2009.

GRAESER, K. A.; STRACHAN, C. J; PATTERSON, J. E.; GORDON, K. C.; RADES, T. Physicochemical properties and stability of two differently prepared amorphous forms of simvastatin. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 128-135, 2008.

HACKAM, G.D.; ANAND, S.S. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. **JAMA.** v. 40, p.290:932, 2003.

HAGYMASI, K.A.; K., Blazovics, A., Lengyel, G., Kocsis, I. and Feher, J Oxidative damage in alcoholic liver disease.**Eur J GastroenterolHepatol.** v.13, n.1, p.49-53, 2001

HARDELAND, R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. **Endocrine.** v. 27, p. 111-118, 2005.

HOUSTON, D.K, JING, D.; LEE, J.S.; GARCIA, M.; KANAYA, A.M.; TYLAVSKI FA, NEWMA, A.B.; VISSER, M.; KRITCHEVSKI, S.B. Dietary fat and cholesterol and risk of cardiovascular disease in older adults: The Health ABC study. **NutrMetabCardiovasc Dis.** v. 21, p. 430-437, 2011.

HUSSAIN, S.A.R. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. **J. Pineal Res.** 42:267-271, 2007.

IRWIN M, WANG M, RIBEIRO D, CHO H, OLMSTEAD R, BREEN E, et al. Sleep loss activates cellular inflammatory signaling. *Biol Psychiatry*. v.64, p.538-40, 2008.

KASSIM, S.H.; LI, H.; VANDENBERGHE, L.H.; HINDERER, C.; BELL, P.; MARCHADIER D.; WILSON, A.; CROMLEY, D.; REDON, V.; YU. H.; RADER, DJ. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. **PLoS One**. V. 19, p. 5-10, 2010.

KETELHUTH DF, BÄCK M. The role of matrix metalloproteinases in atherothrombosis. **Curr Atheroscler Rep**. v.13, p.162-9, 2011.

KURCER Z1, OGUZ E, OZBILGE H, BABA F, AKSOY N, CELIK H, CAKIR H, GEZEN MR. Melatonin protects from ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats: this effect is not mediated by proinflammatory cytokines. **J Pineal Res**. v.43, p.172-8, 2007.

LEIBOWITZ A, VOLKOV A, VOLOSHIN K, SHEMESH C, BARSHACK I, GROSSMAN E. Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress. **J Pineal Res**. v. 60, p.48-54, 2016.

LEU, M.A. CRISSEY, R. TAUB, Massive hepatic apoptosis associated with TGFbeta1 activation after Fas ligand treatment of IGF binding protein-1-deficient mice, **J. Clin. Invest**. v.111, p. 129-139, 2003.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, p.868-74, 2002.

LIMA, L.M.; CARVALHO, M.G.; LOURES-VALE, A.S.; NETO, C.P.F.; GARCIA, J.C.F.; SAAD, J. A.; SOUSA, M.O. Proteína C-reativa ultra sensível em pacientes com diagnóstico de doença arterial coronariana estabelecido por angiografia. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. V. 43, p. 112-118, 2007.

LOPEZ-GIACOMAN S, MADERO M. Biomarkers in chronic kidney disease, from kidney function to kidney damage. *World J Nephrol*. v.4, p. 57-73, 2015.

MANCHESTER LC, COTO-MONTES A, BOGA JA, ANDERSEN LP, ZHOU Z1, GALANO A, VRIEND J, TAN DX, REITER RJ Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable **J Pineal Res**. v.59, p. 403-19, 2015.

MEILHAC, O.; RAMACHANDRAN, S.; CHIANG, K.; SANTANAM, N.; PARTHASARATHY, S. Role of arterial wall antioxidant defense in beneficial effects of exercise on atherosclerosis in mice. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol*. v. 21, n. 10, p. 1681-1688, 2001

MIHAYLOVA, B.; EMBERSON, J.; BLACKWELL, L.; KEECH, A.; SIMES, J.; BARNES, EH. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of

vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials 1. **Lancet**.v.11, p. 581-90, 2012.

MISHRA A, SUMIT, PAUL, SNEHASIKTA S. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 by melatonin during prevention of alcohol-induced liver injury in mice , *Chimie*. v.93, p.854-866, 2011.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I.The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.**J Biol Chem**. v.247, n.10, p.3170-3175, 1972.

MOHAMMADI S, ZAMANI E, MOHADETH Z, MOGTAHEDI F, CHOPAN H, MOGGHIMI F, . Effects of different doses of simvastatin on lead induced kidney damage in Balb/C male mice. **Pharm Sci**. v.20, p.157-62, 2015.

NAJI, L.; CARRILLO-VICO, A.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R.Expression of membrane and nuclear melatonin receptors in mouse peripheral organs. **Life Sci**. v.74, n. 18, p. 2227-2236, 2004.

PADULLA, A.S.T.; AZOUBEL, R.; BONFIM, M.R.; ACCIOLY, M.F.; CAMARGO FILHO, J.C.S.; PADOVANI, J.A. Effects of statin and aerobic physical exercise association in the cardiomyocytes of the rat: morphometric study. **Int J Morphol**. V. 27, p. 83-88, 2009.

ONK D, ONK OA, TURKMEN K, EROL HS, AYAZOGLU TA, KELES ON, HALICI M, TOPAL E. Melatonin Attenuates Contrast-Induced Nephropathy in Diabetic Rats: The Role of Interleukin-33 and Oxidative Stress. **Mediators Inflamm**. v.2016, p. 508-28, 2016.

2016;2016:9050828. doi: 10.1155/2016/9050828. Epub 2016 Feb 18.

OZGUNER, F.; BARDAK, Y.; COMLEKCI, S. Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: a comparative study. **Mol Cell Biochem**. V. 282, p. 83-88, 2006.

REITER, R.J. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans – Review. **Acta BiochPolonica**. v. 50, p.1129-1146, 2003.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A.C.M.; XAVIER, H.T, MAGNONI, C.D.; CASSANI,R.; LOTTENBERG, A.M . Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *ArqBrasCardiol*. v. 100, p.1-40, 2013.

SCHULZ, I. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. **Arq Bras EndocrinolMetab**.v.5, p.344-359, 2006.

SHARMA, R.D. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. **Atherosclerosis**, v.33, p.371-375, 1979

SIGNORI, L. U.; PLENTZ, L. D. M.; IRIGOYEN, M. C.; SCHAAN, M. D. A. O papel da lipemia pós-prandial na gênese da aterosclerose: particularidades do Diabetes Mellitus. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, p. 222- 231, 2007.

SILVA SH, MORESCO RN. Cardiac biomarkers for assessment of acute coronary syndrome. **Sci Med**. v.21, p.132-42, 2011.

SILVA JL, VINAGRE CG, MORIKAWA AT, MARANHÃO RC. The effects of resistance exercise on plasma kinet- The effects of resistance exercise on plasma kinetics of an artificial nanoemulsion that binds to low-density lipoprotein receptors. **Circulation** v.118, p. 359-359, 2008.

SIMKO F, PECHANOVA O, PELOUCH V, KRAJCIROVICOVA K, MULLEROVA M, BEDNAROVA K, ADAMCOVA M, PAULIS L. Effect of melatonin, captopril, spironolactone and simvastatin on blood pressure and left ventricular remodelling in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens Suppl**. v.27, p.5-10, 2009.

SMITH, J.K. Exercise and atherogenesis. **Exerc.and Sports Sci. Rev.**, v. 29, n. 2, p. 49-53, 2001.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. v. 88, p. 2-19, 2007.

SOUZA, S.J.; LUZIA LA, SANTOS SS, RONDÓ PH. Lipid profile of HIV-infected patients in relation to antiretroviral therapy: a review. **Rev Assoc Med Bras**. v.59, p.186-98, 2013.

STEIN, E. A. An investigative look: Selective cholesterol absorption inhibitors-embarking on a new standard of care. *Am. J. Manag Care*, v. 8, p. 36-39, 2002.

SUN H, WANG X, CHEN J, et al. Melatonin improves non-alcoholic fatty liver disease via MAPK-JNK/P38 signaling in high-fat-diet-induced obese mice. **Lipids Health Dis**. v. 15, p.202-11, 2016.

TAMURA, H., TAKASAKI, A., MIWA I, TANIGUCHI, K., MAEKAWA, R., ASADA, H., TAKETANI, T., MATSUOKA, A., YAMAGATA, Y., K., MORIOKA H., ISHIKAWA, H., REITER R. J.. SUGINO N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **J Pineal Res**. v.3, p.280–287, 2008.

XENOULIS, P.G.; STEINER, J.M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. **Vet J**. v.183, p.12- 21, 2010.

WAIKAR SS, BONVENTRE JV. Creatinine kinetics and the definition of acute kidney injury. **J Am SocNephrol**. v.20, p. 672-9, 2009.

World Health Organization. Monitoring framework and targets for the prevention and control of NCDs: a comprehensive global monitoring framework, including indicators, and a set of voluntary global targets for the prevention and control of noncommunicable diseases [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2012.

YAO HC, YANG LJ, HAN QF, WANG LH, WU L, ZHANG CY. Postconditioning with simvastatin decreases myocardial injury in rats following acute myocardial ischemia. **Exp Ther Med.** v.9, p.1166-70, 2015.

ZAHRA GOODARZI.; ESMAEIL KARAMI.; AND MASSUMEH AHMADIZADEH . Simvastatin attenuates chromium-induced nephrotoxicity in rats. **J Nephropathol.**v.1, p.5–9, 2017.

ZHAO L, AN R, YANG Y et al., Melatonin alleviates brain injury in mice subjected to cecal ligation and puncture via attenuating inflammation, apoptosis, and oxidative stress: the role of SIRT1 signaling. *J Pineal Res.* v.59, p 230-9, 2015.

ZHAO Y, FENG Q, HUANG Z, LI W, CHEN B, JIANG L, WU B, DING W, XU G, PAN H, WEI W, LUO W, LUO Q et al. Simvastatin inhibits inflammation in ischemia-reperfusion injury. *Inflammation.* v.37, p.1865-75, 2014.

6. Figuras e gráficos

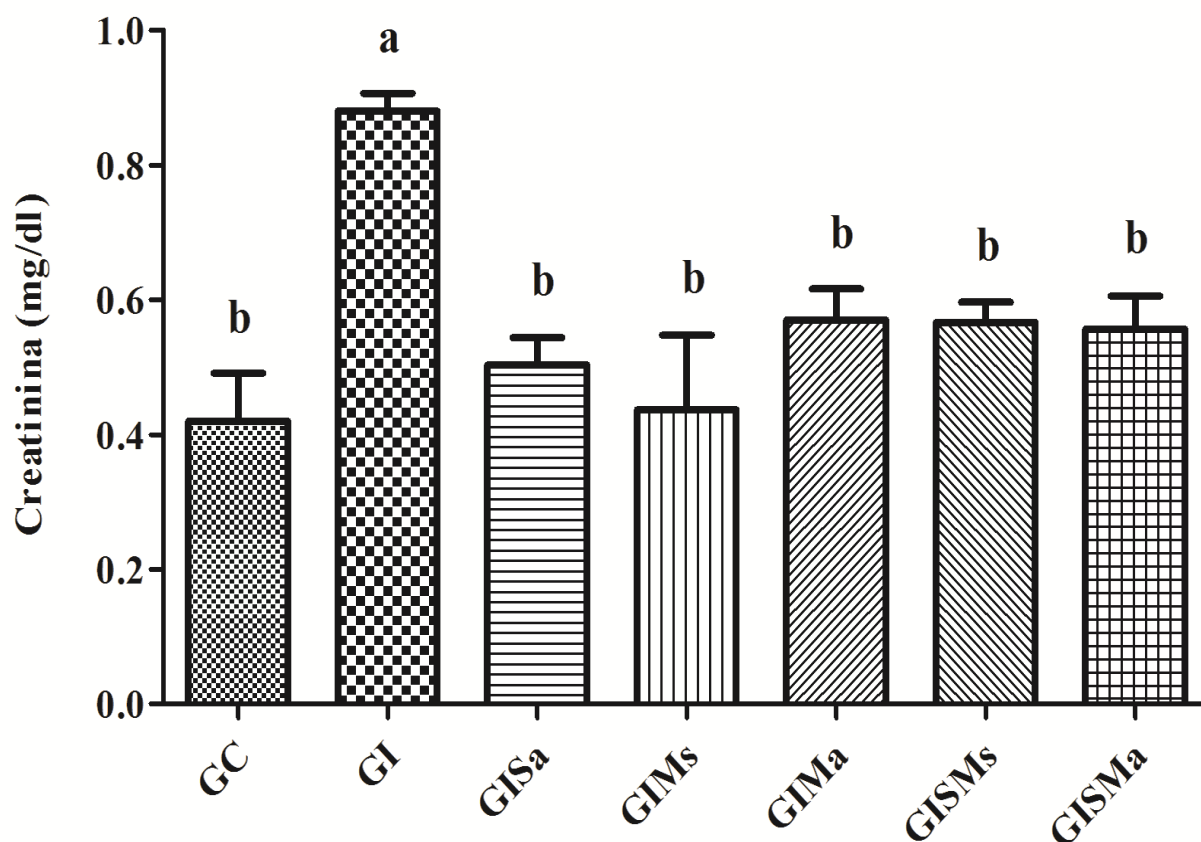


Figura 1. Gráfico dos valores de creatinina (mg/dL) nos diferentes grupos experimentais
*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GISMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GISMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução

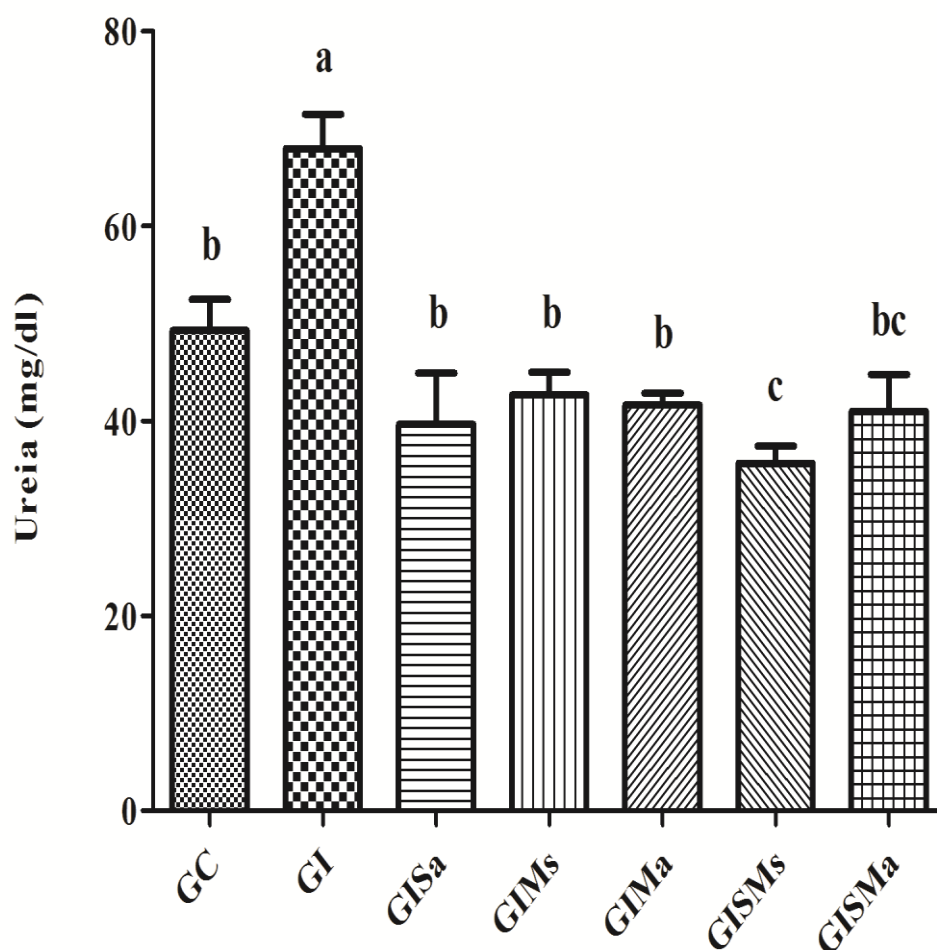


Figura 2. Gráfico dos valores de ureia (mg/dL) dos animais nos diferentes grupos experimentais. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GISMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GISMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução

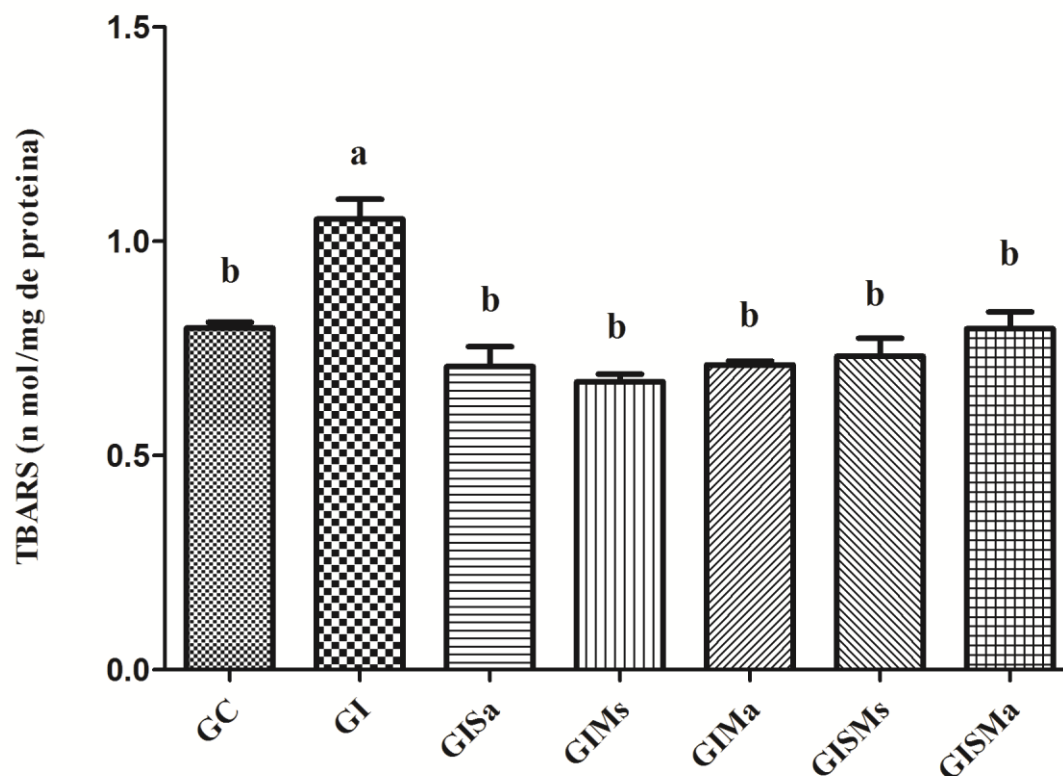


Figura 3: Avaliação da peroxidação lipídica (TBARS) (nmol/mg de proteína) no tecido renal dos animais nos diferentes grupos experimentais. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMsS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMaS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

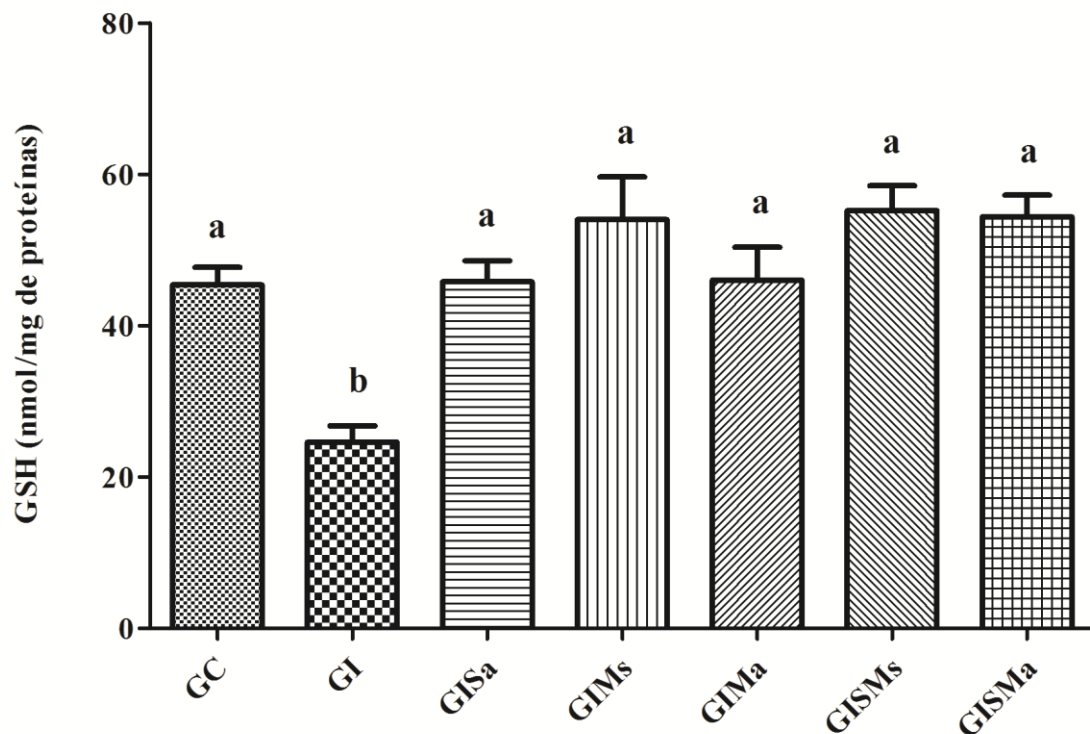


Figura 4. Avaliação dos níveis de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais nos diferentes grupos experimentais GI-GVII) *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMsS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMaS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

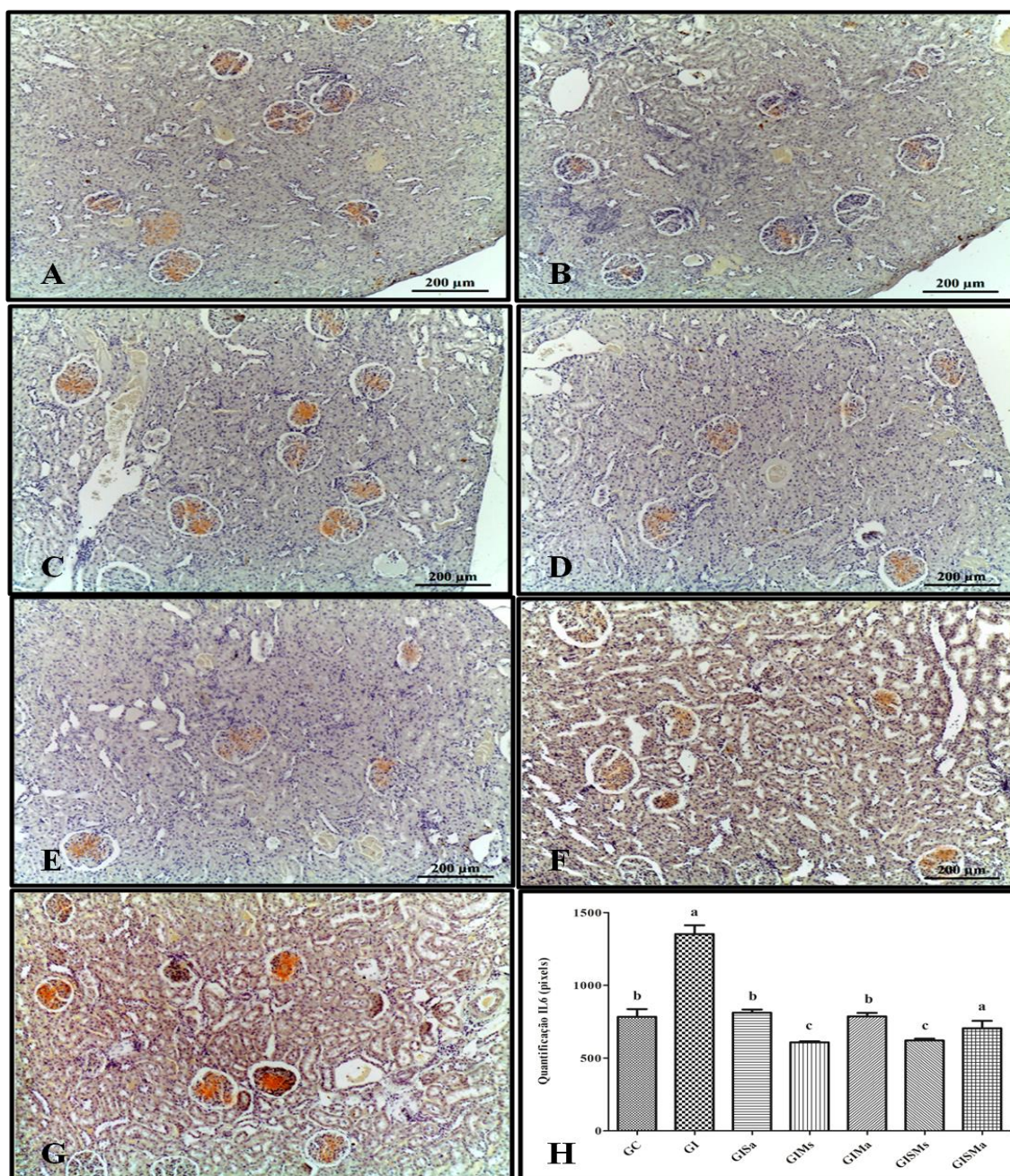


Figura 5. Imunohistoquímica para IL-6 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais.

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMSa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

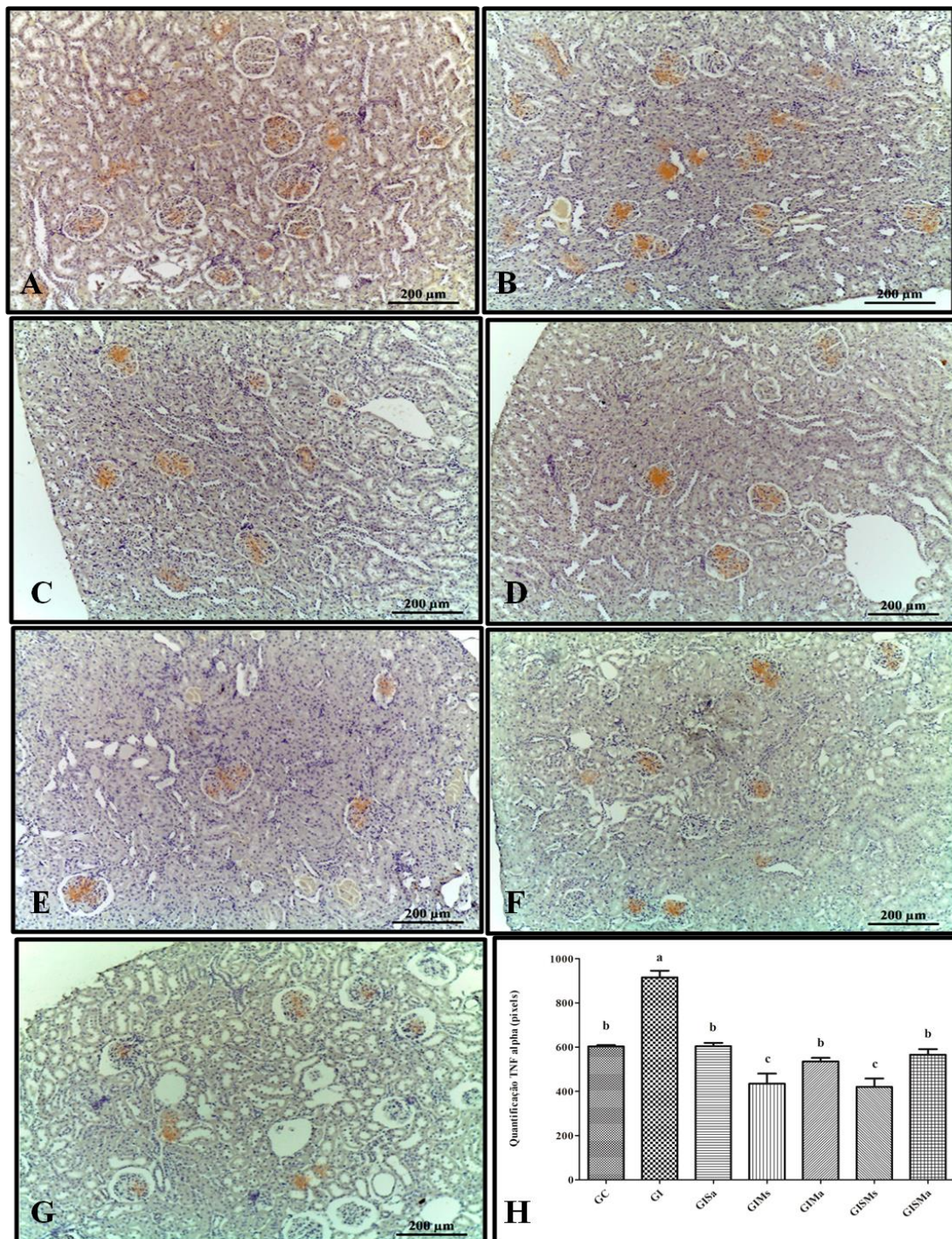


Figura 6. Imunohistoquímica para TNF- α do tecido renal dos diferentes grupos experimentais..

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMsS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e

sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

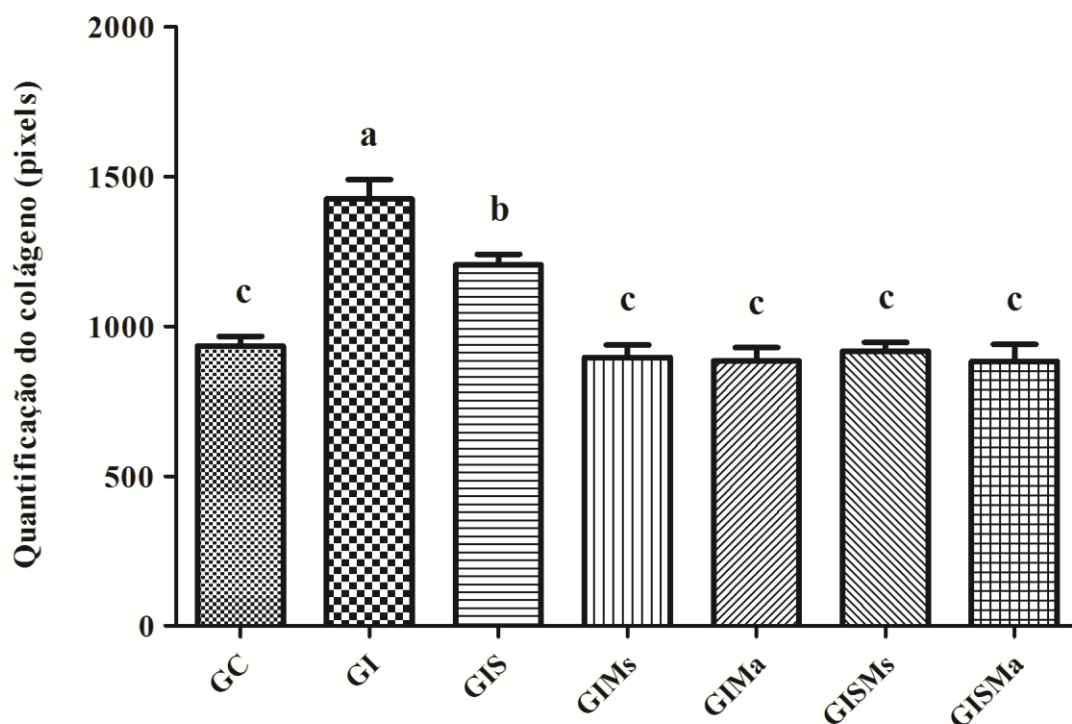


Figura 7. Quantificação das fibras colágenas do tecido renal dos diferentes grupos experimentais.. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: control; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

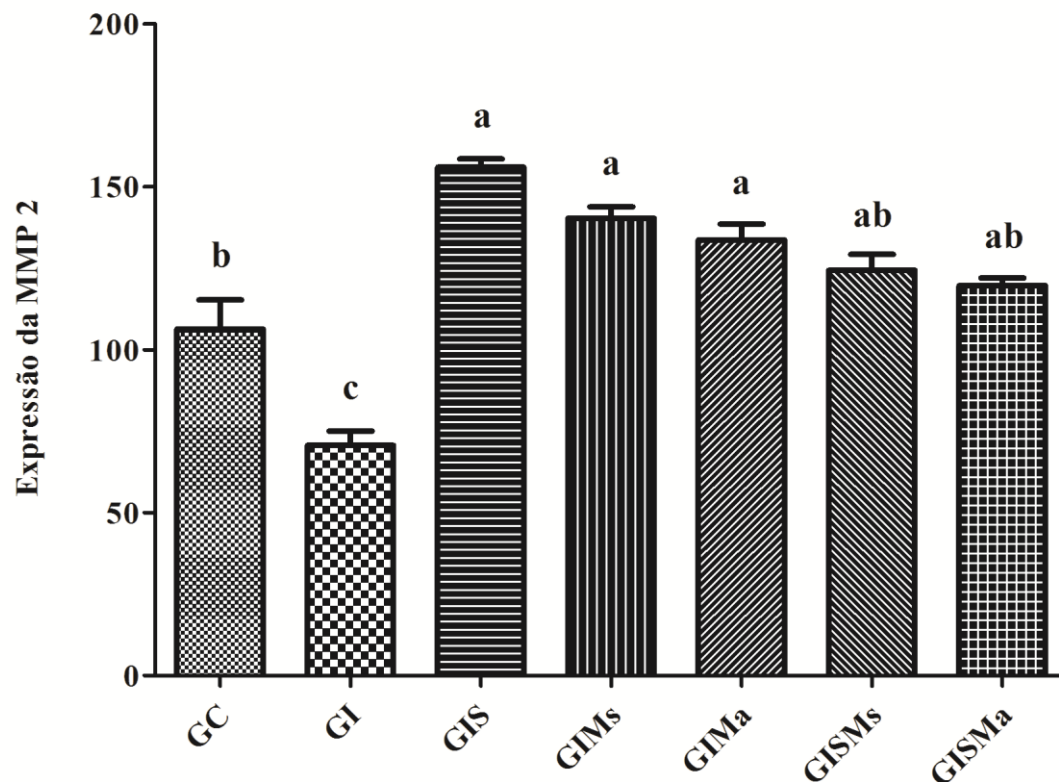


Figura 8. Expressão da MMP-2 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais.. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIM: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GIMSs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GIMS: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.

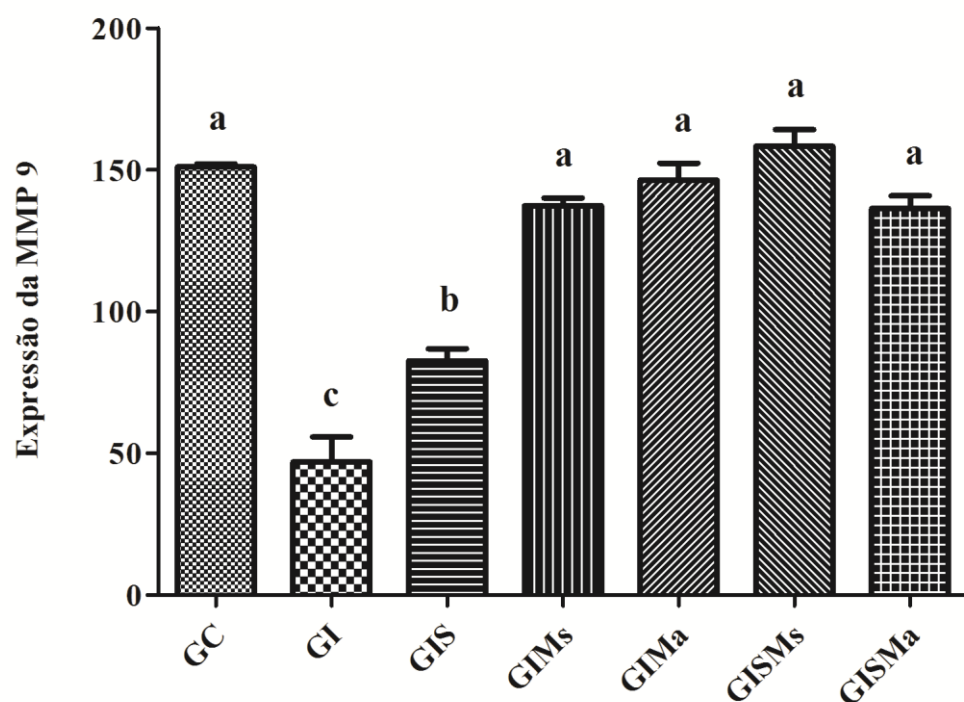


Figura 9: Expressão da MMP-9 do tecido renal dos diferentes grupos experimentais.. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Dunn ($p < 0,05$). GC: controle; GI: induzido à hiperlipidemia; GIS: induzido à hiperlipidemia e tratado com sinvastatina; GIMs: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina simultaneamente à indução; GIMa: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina após indução; GISM s: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina simultaneamente à indução; GISM a: induzido à hiperlipidemia e tratado com melatonina e sinvastatina após à indução.