



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

**CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA**

**Efeito da melatonina associada à insulina no tratamento da  
nefropatia em ratos induzidos ao diabetes**

**RECIFE**

**2019**



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

**CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA**

**Efeito da melatonina associada à insulina no tratamento da nefropatia em ratos induzidos ao diabetes**

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

**Orientador:**

**Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira**

**Co-orientador (a):**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Valéria Wanderley Teixeira**

**Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho**

**RECIFE**

**2019**

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

F383e Ferreira, Cintia Giselle Martins

Efeito da melatonina associada à insulina no tratamento da nefropatia em ratos induzidos ao diabetes / Cintia Giselle Martins Ferreira. – 2019.

126 f. : il.

Orientadora: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira.

Coorientadores: Valéria Wanderley Teixeira ; Leucio Duarte Vieira Filho.

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

Inclui referências.

1. Rins - Doenças - Tratamento 2. Fígado - Doenças - Tratamento  
3. Diabetes - Complicações e sequelas 3. Ratos - Doenças  
4. Melatonina 5. Insulina I. Teixeira, Álvaro Aguiar Coelho, orient. II.  
Teixeira, Valéria Wanderley, coorient. III. Vieira Filho, Leucio Duarte,  
coorient. IV. Título

CDD 636.089

**CINTIA GISELLE MARTINS FERREIRA**

**EFEITO DA MELATONINA ASSOCIADA À INSULINA NO TRATAMENTO DA  
NEFROPATIA EM RATOS INDUZIDOS AO DIABETES**

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

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

---

**Profº. Drº. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Orientador) - UFRPE**

---

**Profª. Drª. Valéria Wanderley Teixeira - UFRPE**

---

**Profº. Drº. Leucio Duarte Vieira Filho - UFPE**

---

**Drª. Ismaela Maria Ferreira de Melo – PNP/ PGCAT/ UFRPE**

---

**Profª. Drª. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório - UFPE**

## DEDICATÓRIA

*“Aos meus avós,  
Lindaura (in memoriam) e Severino Ferreira.”*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

À minha família, agradeço pelo apoio, amor, incentivo e compreensão desde sempre e para sempre. À minha tia Carmelita Moura, ao meu tio Gilvamberto Leite, às minhas primas Érica Leite e Letícia Leite, ao meu irmão Igor Ferreira, meu avô Severino Ferreira e também a Rita Carneiro. Muito obrigada a todos, vocês são demais e muito importantes pra mim!

À Edileuza e Josué Ribeiro, por toda torcida e carinho.

Aos professores e orientadores Álvaro Teixeira e Valéria Teixeira, meu muito obrigada pela oportunidade no laboratório, pela orientação e todos os ensinamentos, tão essenciais para a realização deste trabalho e para minha vida acadêmica. Foram anos de convivência e eu os guardo no meu coração, com muito carinho.

Agradeço imensamente ao meu co-orientador, o professor Leucio Duarte, que esteve sempre de prontidão a nos ajudar nesse trabalho, abrindo as portas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal (LFFR) da UFPE. Agradeço pela paciência, atenção, disponibilidade, brincadeiras e principalmente por todos os ensinamentos e disposição em tirar qualquer dúvida. O meu mais sincero obrigada!

Também agradeço aos membros do LFFR: Juliane Farias, Regina Ayres, Edjair Cabral, Linaldo, Fernanda Ribeiro, Lucas, Natália, Marry e ao técnico Nielson Rodrigues, meu muito obrigada pela receptividade, atenção e toda ajuda!

Meu imenso agradecimento ao professor Valdemiro Júnior, pela paciência, disponibilidade e todo auxílio para a análise das lâminas. Muito obrigada!

Aos bioteristas André e Renata, pelo cuidado com os animais, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho, mas além disso, agradeço pela convivência e momentos de descontração por todo esse tempo.

À Neuma Rejane, sempre muito solícita e atenciosa com todos nós da Pós-Graduação e do laboratório. Obrigada por toda atenção, gentileza e dedicação com todos nós!

Aos meus companheiros do laboratório, componentes e ex-componentes do LABEMOVI: Yuri Albuquerque, Érique Ricardo, Maria Vanessa, Clovis Lapa, Matheus Castro, Falber Ximenes, Vinícius Santiago, Ilka Duarte, Laíse Souza, Cristiane Silva, Hilton Nobre, Glaucilane Santos, Kamilla Dutra, Andrezo, Aline Lira, Carolina Guedes, Valeska, Ana Cláudia, Lais Santos, Hilda Michelly, Anthony Marcos, Bruno Nascimento, Yasmin Santos, muito obrigada pelo carinho, apoio e por tornar o ambiente de trabalho tão agradável!

Não poderia deixar de agradecer também às pessoas que fizeram parte do laboratório quando eu iniciava os meus passos na histologia e as quais compartilharam muitos conhecimentos comigo: Carina Helena, Jeanine Lemos e Fernanda Ângelo, meu imenso obrigado!

Agradeço à Marina Baptista, que compartilhou comigo toda a parte do biotério e foi uma grande companheira, tornando a caminhada mais amena e divertida. Muito obrigada pela amizade, convivência e carinho.

Agradeço especialmente às minhas amigas Caroline Guimarães, Ismaela Melo, Rebeqa Alves, Aline Mariano, Bárbara Brooklyn, Solange Bezerra e Welma Emídio. Não tenho nem palavras pra agradecer a vocês. Gratidão pela paciência, amizade sem igual, palavras de conforto e incentivo! Vocês são incríveis, guardo todas no coração!

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

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

Agradeço de coração à José Carlos, meu companheiro de todas as horas. Muito obrigada por estar ao meu lado sempre, pela paciência nos momentos mais difíceis e de ansiedade, apoio, compreensão, confiança e incentivo.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, instituição que foi a minha segunda casa por tantos anos, também ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal (PPGBA) pela oportunidade e por conceder as instalações para a realização deste trabalho.

À FACEPE pela concessão da bolsa de estudo.

E por fim, meu obrigada também àqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada a todos! Sem vocês, com certeza eu não chegaria até aqui!

## RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é um distúrbio crônico, caracterizado por alteração no metabolismo da glicose e outras substâncias produtoras de energia, que resulta em aumento do estresse oxidativo. A nefropatia associada ao DM é uma das mais sérias e comuns complicações microvasculares e os seus efeitos nos rins ocorrem em diversas estruturas, como glomérulos e túbulos. Da mesma forma, diversas modificações hepáticas podem ser observadas, como as hepatopatias, doença hepática não gordurosa e dislipidemias. A melatonina é um hormônio produzido pela glândula pineal, descrito por apresentar efeitos benéficos no estresse oxidativo associado a doenças. Por apresentar baixa toxicidade, esse hormônio tem sido associado à outros fármacos, como a insulina. Assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar os efeitos do tratamento com melatonina e insulina sobre a nefropatia e os possíveis efeitos deletérios no fígado de ratos induzidos ao diabetes. Foram utilizados 50 ratos albinos, com 60 dias de idade, divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução ao diabetes; GD: ratos induzidos ao diabetes; GDM: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina; GDI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina; GDMI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina e insulina. O diabetes foi induzido por administração única de estreptozotocina na dosagem de 50mg/kg, por via intraperitoneal. Já a terapia com a melatonina foi realizada via água de beber (10mg/kg), enquanto a administração de insulina por meio de injeção subcutânea (5U/dia), ambos durante 30 dias. Após os respectivos tratamentos, foram analisados a histopatologia, morfometria, histoquímica (quantificação de glicogênio e colágeno) e a função renal e hepática. Além disso, os parâmetros metabólicos como peso corporal, consumo alimentar, diurese e as excreções de glicose, albumina e proteína foram acompanhadas, junto com a pressão arterial sistólica, enzimas hepáticas, perfil lipídico, glicêmico e o estresse oxidativo (TBARS e GSH). Após o tratamento associativo com melatonina e insulina, verificou-se que os parâmetros renais e hepáticos estudados foram similares aos do grupo controle, com preservação da estrutura tecidual, melhora do perfil lipídico e da funcionalidade renal e hepática, com redução dos níveis de colesterol, triglicerídeos, creatinina, ureia, AST e ALT, respectivamente.

Mostrou-se ainda que a associação normalizou os níveis da peroxidação lipídica, assim como aumentou os valores da glutathiona reduzida, seja no fígado ou no rim dos animais. Também observamos a melhora nas alterações metabólicas (polifagia, poliúria e polidipsia), nas excreções urinárias de glicose, proteína e albumina, bem como redução no acúmulo de glicogênio e colágeno renal. Já a nível hepático, o teor de glicogênio foi recuperado após tratamento e o nível de colágeno estava reduzido. Junto a isso, a pressão arterial sistólica, frequência cardíaca e imunomarcagem para o IL-6 e TNF- $\alpha$  no fígado dos animais também apresentaram comportamento similar ao grupo controle. Assim, concluímos que o tratamento associativo entre melatonina e insulina pode ser uma estratégia eficaz na proteção contra os danos hepáticos e renais induzidos pela hiperglicemia em animais diabéticos.

**Palavras-chave:** nefropatia diabética, melatonina, insulina, fígado, estresse oxidativo, ratos

## ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disorder characterized by alterations in the metabolism of glucose and other energy-producing substances, which results in increased oxidative stress. DM-associated nephropathy is one of the most serious and common microvascular complications and its effects on the kidneys occur in several structures, such as glomeruli and tubules. In the same way, several liver modifications can be observed, such as liver diseases, non-fatty liver disease and dyslipidemias. Melatonin is a hormone produced by the pineal gland, described as having beneficial effects on oxidative stress associated with disease. Because it has low toxicity, this hormone has been associated with other drugs, such as insulin. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of melatonin and insulin treatment on nephropathy and the possible deleterious effects in the liver of rats induced diabetes. Fifty-five day-old albino rats were divided into the following groups: GC: rats without diabetes induction; GD: rats induced to diabetes; GDM: rats induced to diabetes and treated with melatonin; GDI: rats induced to diabetes and treated with insulin; GDMI: rats induced to diabetes and treated with melatonin and insulin. Diabetes was induced by single administration of streptozotocin at a dose of 50 mg/kg intraperitoneally. Melatonin therapy was performed via drinking water (10mg/kg), while the administration of insulin by subcutaneous injection (5U/day), both for 30 days. After the respective treatments, histopathology, morphometry, histochemistry (quantification of glycogen and collagen) and renal and hepatic function were analyzed. In addition, metabolic parameters such as body weight, dietary intake, diuresis and excretions of glucose, albumin and protein were accompanied, along with systolic blood pressure, liver enzymes, lipid profile, glycemic profile and oxidative stress (TBARS and GSH). After the associative treatment with melatonin and insulin, it was verified that the renal and hepatic parameters studied were similar to those of the control group, with preservation of tissue structure, improvement of lipid profile and renal and hepatic function, with reduction of cholesterol levels, triglycerides, creatinine, urea, AST and ALT, respectively. It was also shown that the association normalized the levels of lipid peroxidation, as well as increased values of reduced glutathione, either in the liver or kidney of the animals. We

also observed improvement in metabolic changes (polyphagia, polyuria and polydipsia), urinary excretions of glucose, protein and albumin, as well as reduction in the accumulation of glycogen and renal collagen. At the liver level, the glycogen content was recovered after treatment and the level of collagen was reduced. In addition, systolic blood pressure, heart rate, and immunostaining for IL-6 and TNF- $\alpha$  in the liver of the animals also showed similar behavior to the control group. Thus, we conclude that associative treatment between melatonin and insulin may be an effective strategy to protect against hepatic and renal damage induced by hyperglycemia in diabetic animals.

**Keywords:** diabetic nephropathy, melatonin, insulin, liver, oxidative stress, rats

## SUMÁRIO

| Capítulos |  | Pág. |
|-----------|--|------|
| I         | 1. INTRODUÇÃO.....   | 23   |
|           | 2. REVISÃO DE LITERATURA.....  | 26   |
|           | 2.1 Diabetes Mellitus.....   | 26   |
|           | 2.1.1. Definição, epidemiologia e classificação.....                           | 26   |
|           | 2.1.2. Sinais clínicos e diagnóstico.....                                      | 28   |
|           | 2.1.3. Complicações decorrentes do Diabetes Mellitus.....                      | 29   |
|           | 2.1.4. Modelo experimental do Diabetes Mellitus.....                           | 31   |
|           | 2.2. Nefropatia Diabética.....   | 33   |
|           | 2.2.1 Definição, progressão e diagnóstico.....                                 | 33   |
|           | 2.3. Fisiopatologia da nefropatia diabética.....                               | 35   |
|           | 2.3.1. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo.....                 | 36   |
|           | 2.3.2. Alterações hemodinâmicas.....   | 39   |
|           | 2.3.3. Alterações estruturais.....   | 41   |
|           | 2.3.4. Citocinas inflamatórias.....  | 42   |
|           | 2.4. Tratamentos para a nefropatia diabética.....                              | 44   |
|           | 2.4.1. Insulina.....   | 44   |
|           | 2.5. Melatonina.....   | 46   |
|           | 2.5.1. Características gerais e mecanismo de ação.....                         | 46   |
|           | 2.5.2. Capacidade antioxidante da melatonina e complicações<br>diabéticas..... | 50   |
|           | 3.OBJETIVOS.....   | 53   |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
|            | REFERÊNCIAS.....   | 54  |
| <b>II</b>  | Administração da melatonina combinada à insulina previne os efeitos da nefropatia diabética em ratos.....  | 70  |
|            | RESUMO.....  | 71  |
|            | ABSTRACT.....  | 72  |
|            | INTRODUÇÃO.....  | 72  |
|            | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 74  |
|            | RESULTADOS.....  | 77  |
|            | DISCUSSÃO.....   | 81  |
|            | REFERÊNCIAS.....   | 84  |
| <b>III</b> | Tratamento associativo com melatonina e insulina pode reverter alterações hepáticas decorrentes da hiperglicemia em ratos induzidos ao diabetes..... | 107 |
|            | RESUMO.....  | 107 |
|            | ABSTRACT.....  | 107 |
|            | INTRODUÇÃO.....  | 108 |
|            | MATERIAL E MÉTODOS.....  | 108 |
|            | RESULTADOS.....  | 110 |
|            | DISCUSSÃO.....   | 111 |
|            | REFERÊNCIAS.....   | 113 |

## LISTA DE FIGURAS

| CAPÍTULO I   | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1:</b> Hiperglicemia crônica e as complicações decorrentes do DM.....  | 31   |
| <b>Figura 2:</b> Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....  | 37   |
| <b>Figura 3:</b> Via metabólica da síntese de melatonina.....  | 47   |
| <br>   |      |
| CAPÍTULO II  |      |
| <b>Figura 1:</b> Concentrações sanguíneas de hemoglobina glicada nos diferentes tempos e grupos experimentais. A: HbA1c antes da indução ao diabetes. B: HbA1c após confirmação do diabetes. C: HbA1c aos 15 dias das administrações. D: HbA1c aos 30 dias das administrações. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).....  | 102  |
| <b>Figura 2:</b> Gráficos dos parâmetros metabólicos nos diferentes tempos e grupos experimentais. A: Peso corporal (g). B: Consumo alimentar (g). C: Consumo hídrico (mL). D: Volume urinário (mL). Valores Basal, 0, 15 e 30 dias, respectivamente. *Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).....   | 103  |
| <b>Figura 3:</b> Fotomicrografias do parênquima renal dos animais dos grupos experimentais. A: grupo controle (GC). B-D: grupo diabético (GD). E: grupo diabético tratado com melatonina (GDM). F: grupo diabético tratado com insulina (GDI). G-H: grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). GL - glomérulo; ES – espaço subcapsular; TCP – túbulo contorcido proximal; TCD – túbulo contorcido distal; GA – atrofia glomerular; NT - necrose tubular; * - glomerulonefrite membranoproliferativa; GS – segmentação glomerular; DC – debris celulares; seta preta – vacuolização; |      |

seta tracejada – degeneração hidrópica; cg – congestão; IN – infiltrado inflamatório. H.E..... 104

**Figura 4:** Quantificação histoquímica nos rins dos diferentes grupos experimentais. A: Quantificação de grânulos de glicogênio. Coloração PAS. B: Quantificação de fibras colágenas. Coloração Sirius red. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova One-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 105

**Figura 5:** Quantificação do status antioxidante nos diferentes grupos experimentais. A: Peroxidação Lipídica (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. B: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 106

### CAPÍTULO III

**Figura 1:** Concentrações sanguíneas de glicose nos diferentes tempos e grupos experimentais (mg/dL). (A) - Glicemia antes da indução ao diabetes. (B) - Glicemia após confirmação do diabetes. (C) - Glicemia aos 15 dias das administrações. (D) – Glicemia aos 30 dias das administrações. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 121

**Figura 2:** Fotomicrografias do parênquima hepático dos animais dos grupos experimentais. (A) - grupo controle (GC). (B-C) - grupo diabético (GD). (D) - grupo diabético tratado com melatonina (GDM). (E) - grupo diabético tratado com insulina (GDI). (F)- grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). Hepatócitos (seta dupla). Sinusóides (S). Veia centrolobuar (VC). Sinusóides dilatados (ponta de seta preta). Microesteatose (ponta de seta branca). Trombo (\*). Necrose massiva (NE). Infiltrado inflamatório (seta preta grossa). Células bi-nucleadas (seta branca grossa). Vacuolização (seta amarela). Congestão leve (estrela). H.E..... 122

**Figura 3:** Quantificação histoquímica no fígado dos diferentes grupos experimentais (pixels). (A) - Quantificação de grânulos de glicogênio. Coloração: PAS. (B) - Quantificação de fibras colágenas. Coloração: Sirius red. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 123

**Figura 4:** Imunohistoquímica para a citocina IL-6 no fígado dos animais dos grupos experimentais. (A) - grupo controle (GC). (B) - grupo diabético (GD). (C) - grupo diabético tratado com melatonina (GDM). (D) - grupo diabético tratado com insulina (GDI). (E) - grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). (F) - Quantificação em pixels do IL-6. \*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 124

**Figura 5:** Imunohistoquímica para o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no fígado dos animais dos grupos experimentais. (A) – grupo controle (GC). (B) – grupo diabético (GD). (C) – grupo diabético tratado com melatonina (GDM). (D) – grupo diabético tratado com insulina (GDI). (E) – grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). (F) – Quantificação em pixels do TNF- $\alpha$ . \*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 125

**Figura 6:** Quantificação do status antioxidante nos diferentes grupos experimentais. (A) - Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. (B) - Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ )..... 126

## LISTA DE TABELAS

| <b>CAPÍTULO I</b>  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Tabela 1:</b> Critérios diagnósticos para diagnósticos para portadores de pré-diabetes e diabetes mellitus.....   | 29          |
| <b>Tabela 2:</b> Estágios clínicos da nefropatia diabética.....  | 34          |
| <b>Tabela 3:</b> Metas glicêmicas para insulinoterapia.....  | 45          |
| <br><b>CAPÍTULO II</b>   |             |
| <b>Tabela 1:</b> Médias $\pm$ desvio padrão dos níveis de plasmáticos de glicose nos diferentes tempos e grupos experimentais (mg/dL).....                                     | 94          |
| <b>Tabela 2:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais ao 0 dia de tratamento.....    | 95          |
| <b>Tabela 3:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais aos 15 dias de tratamento..... | 96          |
| <b>Tabela 4:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais aos 30 dias de tratamento..... | 97          |
| <b>Tabela 5:</b> Urinálise dos animais dos grupos experimentais ao 0 dia de tratamento.....  | 98          |
| <b>Tabela 6:</b> Urinálise dos animais dos grupos experimentais aos 15 dias de tratamento.....   | 99          |
| <b>Tabela 7:</b> Urinálise dos animais dos grupos experimentais aos 30 dias de tratamento.....   | 100         |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabela 8:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão do diâmetro corpuscular, área corpuscular, área do tufo glomerular, área subcapsular e índice organossomático dos rins..... | 101 |
|---|-----|

### **CAPITULO III**

|  |     |
|--|-----|
| <b>Quadro 1:</b> Médias $\pm$ desvio padrão dos valores bioquímicos ao 0 dia experimental..... | 119 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Quadro 2:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão dos valores bioquímicos aos 15 dias experimentais..... | 119 |
|--|-----|

|  |     |
|--|-----|
| <b>Quadro 3:</b> Médias $\pm$ desvio-padrão dos valores bioquímicos aos 30 dias experimentais..... | 120 |
|--|-----|

|   |     |
|---|-----|
| <b>Quadro 4:</b> Médias $\pm$ desvio padrão dos hepatócitos, sinusóides, veia centrolobular, espaço porta, veia hepática e células de Kupffer no fígado dos animais dos grupos experimentais..... | 120 |
|---|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Acetil-coA** – Acetil coenzima A
- ADA** – Associação Americana de Diabetes
- AGES** – Produtos finais de glicação avançada
- AMFK** - N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
- AMK** – N-acetil-5-metoxiquinuramina
- AMPc** – Adenosina monofosfato cíclico
- ANG II** – Angiotensina II
- ALT** – Alanina aminotransferase
- ALP** – Alcalina fosfatase
- AST** - Aspartato aminotransferase
- Bpm** – Batimentos por minuto
- BSA** – Albumina sérica bovina
- CAD** – Cetoacidose diabética
- CAT** – Catalase
- CrCl** – Clearance de creatinina
- CTGF** – Fator de crescimento do tecido conjuntivo
- COX-2** – Ciclo-oxigenase 2
- DCNTS** – Doenças crônicas não transmissíveis
- DM** – Diabetes mellitus
- DMG** – Diabetes mellitus gestacional
- DMT1** – Diabetes mellitus do tipo 1
- DMT2** – Diabetes mellitus do tipo 2
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DTNB** - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
- DRC** – Doença renal crônica
- DRD** – Doença renal diabética
- EDTA** - Ácido etilenodiaminotetracético

**EO** – Estresse oxidativo

**EROS** – Espécies reativas de oxigênio

**ERNS** - Espécies reativas de Nitrogênio

**EUA** – Excreção urinária de albumina

**FC** – Frequência cardíaca

**GADA** – Antidescarboxilase de ácido glutâmico

**GADPH** – Gliceraldeído-3-fosfato

**GJA** – Glicemia de jejum alterada

**Gi** – Proteína G inibitória

**GLUTs** – Transportadores de glicose

**GLUT1** – Transportador de glicose do tipo 1

**GLUT2** – Transportador de glicose do tipo 2

**GMPc** – Guanosina monofosfato cíclico

**GPRC** – Receptores de alta afinidade acoplados à proteína G

**GS** – Glicogênio sintase

**GSH** – Glutathiona reduzida

**GPx** – Glutathiona peroxidase

**GPr** – Glutathiona redutase

**GQ** - Glicoquinase

**G6PD** - glicose-6-fosfatase desidrogenase

**HAS** –Hipertensão arterial sistêmica

**HbA1c** – Hemoglobina glicada

**HE** – Hematoxilina-eosina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio

**5 – HTP** – 5 –hidroxitriptofano

**5- HTPD** – 5 – hidroxitriptofano descarboxilase

**IAA** – Anticorpos anti-insulina

**ICA** – Anticorpos anti-ilhotas

**IDF** – Federação internacional de Diabetes

**IL-1** – Interleucina 1

**IL- 6** – Interleucina 6

**IOR** – Índice organossomático renal

**IRC** – Insuficiência renal crônica

**IP3** – Inositol fosfato

**KCL** - Cloreto de potássio

**LADA** – Diabetes autoimune latente do adulto

**LPO** – Peroxidação lipídica

**MAPK** – Proteína quinase ativadora de mitogênese

**MBG** – Membrana basal glomerular

**MDA** - Malonaldeído

**MLT** - Melatonina

**MmHg** – Milímetro de mercúrio

**MT1** – Receptor de melatonina tipo 1

**MT2** – Receptor de melatonina tipo 2

**MT3** - Receptor de melatonina tipo 3

**NADPH** – Nicotinamida adenina dinucliotídeo fosfato reduzida

**NAFLD** - Doença hepática gordurosa não alcoólica

**NAS** – N- acetilserotonina

**NAT** – N- acetiltransferase

**ND** – Nefropatia diabética

**NF –kB** – Fator de transcrição nuclear

**NPV** – Núcleo paraventricular do hipotálamo

**NSQ** – Núcleos supraquiasmáticos

**OH<sup>•</sup>** - Hidroxilas

**ON** – Óxido nítrico

**ONOO<sup>•</sup>** - Peroxinitrito

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** - Ânion superóxido

**PARP** – Poli (ADP-ribose) polimerase

**PAS** – Ácido periódico de schiff

**PASis** – Pressão arterial sistólica

**PBS** – Tampão fosfato salino

**PKC** – Proteína quinase C

**QR2** – Quinona redutase 2

**RI** - Resistência à insulina

**RD** – Retinopatia diabética

**SBD** – Sociedade Brasileira de Diabetes

**SDS** - Dodecil sulfato de sódio

**SOD** – Superóxido-dismutase

**SREBP-1c** – Proteínas de ligação a elementos reguladores de esterol

**SREBP-2** - Fator de transcrição de ligação do elemento regulador do esterol 2

**STZ** – Estreptozotocina

**TBARS** – Substâncias reagentes ao ácido tiobarbitúrico

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TEP** - 1,1,3,3-tetraetoxi-propano

**TFG** – Taxa de filtração glomerular

**TGD** – Tolerância à glicose diminuída

**TGF  $\beta$**  – Fator de crescimento transformante Beta 1

**TPH** – Triptofano hidroxilase

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TRIS** – Tris (hidroximetil) aminometano

**T-SH** – Tíol total

**TTG** – Teste de tolerância à glicose

**VEGF** – Fator de crescimento vascular

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é um grave e crescente problema de saúde pública, com características epidêmicas, tanto em termos de número de pessoas afetadas e mortalidade prematura, como também, em relação aos custos envolvidos no controle e tratamento das complicações vasculares específicas da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), cerca de 425 milhões de pessoas são portadoras de diabetes no mundo e estima-se que até o ano de 2045, esse valor chegue a aproximadamente 629 milhões de pessoas acometidas por este distúrbio crônico (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017).

O DM caracteriza-se por um grupo de distúrbios metabólicos crônicos, resultante da condição de hiperglicemia, devido a deficiência na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, ação da insulina, ou ambos os fatores (DEEPTHI et al., 2017).

A longo prazo, o DM leva a complicações macro e microvasculares, que afetam diversos órgãos e a qualidade de vida dos portadores (CHAWLA; CHAWLA; JAGGI, 2016). A nível macrovascular, ocorre o acometimento coronariano e de vasos sanguíneos, principalmente relacionados com o aumento da pressão arterial sistêmica (SALIDO et al., 2013), enquanto que os danos microvasculares incluem principalmente a lesão na retina e nos rins, sendo responsáveis, respectivamente, pela retinopatia e nefropatia diabética (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; GROSS et al., 2002).

A nefropatia diabética (ND) constitui uma das complicações mais graves do DM. Sendo considerada a principal causa de insuficiência renal crônica (IRC) e indicação para diálise e transplante, afeta cerca de 30%-50% dos portadores de diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Os estágios progressivos da ND podem ser reconhecidos clinicamente, mas deve-se iniciar o rastreamento preferencialmente pela medida de albumina em amostra de urina, devido à eficiência diagnóstica e à facilidade desse tipo de coleta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Os efeitos danosos nos rins dos portadores de diabetes, ocorrem diretamente nos glomérulos, foco principal de lesão na nefropatia diabética, porém, outras estruturas renais também podem ser acometidas. Como observado em estudos histopatológicos em humanos e animais de experimentação (ratos e camundongos), que demonstraram a presença de esclerose glomerular, aumento de matriz extracelular e membrana basal, além de proliferação mesangial (LAGRANHA et al., 2007; POURGHASEM; SHAFI; BABAZADEH, 2015).

O estresse oxidativo tem sido apontado como uma das principais causas das complicações renais no quadro diabético. Muitas das alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia produzem estresse oxidativo devido ao aumento de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS), gerados principalmente durante a auto-oxidação da glicose e em diferentes reações oxidativas que acompanham a glicação de proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (DÍAZ-FLORES et al, 2004). Além disso, também ocorre diminuição da ação dos sistemas de defesa antioxidante em consequência da diminuição da disponibilidade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) e da glutatona reduzida (GSH), assim como pelo dano oxidativo das enzimas envolvidas (DÍAZ-FLORES et al, 2004).

Outro fator muito importante para a gênese das complicações da ND é a produção de citocinas inflamatórias e fatores fibrogênicos, onde o acúmulo dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no tecido renal leva à um aumento da produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- $\alpha$ . Da mesma maneira, os níveis séricos e de excreção urinária destas citocinas e os níveis de TGF- $\beta$  estão aumentados em humanos e animais com o quadro de diabetes (LAGRANHA et al., 2007; SCHMITD, 1996).

Como terapia convencional para o DM Tipo 1, é utilizada, principalmente, a reposição hormonal através da insulina. A insulina é um hormônio anabólico que, após interação com seu receptor de membrana específico, estimula a captação de glicose pelas células por meio de proteínas integrais de membrana, denominadas GLUTs. Tal evento regula a homeostase glicêmica, estimula a lipogênese hepática e nos adipócitos, reduz a lipólise, bem como, regula o turnover proteico (SABETSKY; EKBLUM, 2010). Apesar de essencial

para o controle glicêmico e para evitar a cetoacidose diabética, que antes do seu descobrimento era muito comum em pessoas que sofriam com essa doença, o tratamento isolado com a insulina não é capaz de evitar as complicações microvasculares do diabetes, inclusive a nefropatia (PINHEIRO et al., 2011).

Vários estudos têm utilizado substâncias com atividades antioxidantes a fim de prevenir e/ou reduzir o estresse oxidativo no diabetes, diminuindo assim, a oxidação da glicose e, conseqüentemente, inibindo o desenvolvimento de suas complicações tardias (REITER et al., 2001). Dentre estas substâncias antioxidantes, temos a melatonina.

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado, principalmente, pela glândula pineal dos vertebrados. Além de suas ações como um eliminador de radicais livres, ela também possui atividades sobre o metabolismo da glicose, imunomoduladoras e estimulante de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase, o que promove ainda mais a sua capacidade de reduzir a toxicidade dos radicais livres e dos seus reagentes associados (ALVES et al., 2004; REITER et al., 2001; TAMURA et al., 2008).

Estudos têm mostrado que a melatonina reduz o estresse oxidativo e diminui a apoptose na retina, cérebro e fígado de ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina (PADILLO et al., 2004; RAO et al., 2002). Além disso, relata-se também que a melatonina tem a capacidade de reduzir a hiperglicemia e hiperlipidemia em ratas e ratos diabéticos (NISHIDA et al., 2005).

Dessa forma, se faz necessária novas pesquisas para o tratamento dos efeitos deletérios dessa doença, uma vez que a administração de insulina não consegue evita-las (SOARES, 2000). Assim, como a melatonina é um poderoso antioxidante que apresenta efeitos moduladores em vários órgãos, a presente pesquisa objetivou avaliar se a sua presença associada à insulina poderia ser um importante meio potencializador dos efeitos desse hormônio, diminuindo ou eliminando as alterações causadas pelo diabetes nos rins e fígado de ratos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 DIABETES MELLITUS**

#### **2.1.1 Definição, epidemiologia e classificação**

O Diabetes Mellitus (DM), normalmente conhecido como diabetes, é um sério e crescente problema de saúde pública em todo o mundo. Atingindo proporções epidêmicas, se enquadra, atualmente, nas chamadas doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) e é considerada uma das principais causas de internação e óbito, junto com as doenças respiratórias crônicas, neoplasias e as enfermidades cardiovasculares (MALTA et al., 2017; SILVEIRA et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O DM é caracterizado por um grupo de distúrbios metabólicos crônicos, resultante da condição de hiperglicemia, devido a deficiência na secreção de insulina pelas células  $\beta$  do pâncreas, ação da insulina, ou ambos os fatores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; BALAKUMAR et al., 2009; OLIVEIRA, 2009). Atualmente, a classificação do DM é baseada na sua etiologia e inclui quatro principais categorias clínicas: o Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1), o Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2), o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) e os tipos específicos de Diabetes Mellitus. Além disso, existe ainda a glicemia de jejum alterada (GJA) e a tolerância à glicose diminuída (TGD), as quais são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e das doenças cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; ZIMMET; ALBERT; SHAW, 2001).

A prevalência, incidência e conseqüentemente os custos envolvidos no controle do DM são cada vez maiores (SILVEIRA et al., 2016). Segundo a 8ª edição do atlas da Federação Internacional de Diabetes (IDF) em 2017 existiam aproximadamente 425 milhões de portadores de diabetes no mundo, e estima-se que até o ano de 2045, esse valor chegue em torno de 629 milhões de pessoas acometidas por este distúrbio crônico (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). No Brasil, os dados também são preocupantes. Ocupando o 4º lugar no ranking dos 10 países com o maior número de portadores de diabetes, cerca de 8% da população sofre com a enfermidade, o que equivale, a valores próximos de 16 milhões de diabéticos,

com uma faixa etária variando dos 20 aos 79 anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

O DMT1 representa cerca de 5% a 10% dos casos de diabetes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Sendo anteriormente conhecido pelos termos “diabetes insulino-dependente” ou “diabetes juvenil”, resulta na destruição parcial ou total das células  $\beta$  do pâncreas, levando a um quadro de insuficiência na produção ou secreção de insulina (SANTOS; LEPRI, 2012). Apesar de primariamente ser reconhecido por afetar aproximadamente 80 a 90% de crianças e adolescentes, a incidência das características do DMT1 vem aumentando consideravelmente em adultos, onde já se conceitua uma nova categoria definida como LADA (diabetes autoimune latente do adulto) (ALVES et al., 2016).

Muitos estudos demonstram que no desenvolvimento do DMT1 os fatores genéticos, imunológicos e ambientais estão diretamente envolvidos (ONENGUT-GUMUSCU et al., 2002). Dessa forma, atualmente, esse tipo de diabetes é subdividido em DMT1 tipo 1A e DMT1 tipo 1B, o que depende do processo que irá desencadear a destruição das células  $\beta$  pancreáticas. No primeiro tipo, a destruição dessas células ocorre por um processo autoimune, levando a um quadro de insulite e presença de uma variedade de autoanticorpos, como: antidescarboxilase de ácido glutâmico (GADA), anti-ilhotas (ICA) e anti-insulina (IAA) (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Já no tipo 1B a perda das ilhotas pancreáticas ocorre de forma desconhecida e é observada a ausência de insulite e autoanticorpos, caracterizando a forma idiopática da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; GROSS et al., 2002, 2005; PASCHOU et al., 2018; WAJCHENBERG, 1992).

A manifestação mais comum do diabetes é o DMT2, representando 90% a 95% dos casos diagnosticados da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). Previamente definida como “diabetes não insulino-dependente” ou “diabetes do adulto”, essa forma de acometimento inclui os indivíduos que apresentam um quadro de resistência à insulina (RI) e uma resposta compensatória inadequada da mesma. Esse aumento da resistência

periférica ao hormônio se dá devido a defeitos na cascata de sinalização ou no próprio receptor de insulina (JONNALAGADDA et al., 2014; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Sendo assim, os tecidos alvos não usam adequadamente a insulina com o efeito de fatores como a idade, obesidade e sedentarismo ou as células beta pancreáticas tornam-se progressivamente menos capazes de secretar insulina em quantidade suficiente para manter a homeostase dos carboidratos e lipídios (ABIOLA; SATHYAPALAN; HEPBURN, 2016; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; BELL; POLONSKY, 2001; SALTIEL; KAHN, 2002).

Quando o aumento nos valores da glicose é detectado pela primeira vez durante uma gestação, ocorre o que é classificado como diabetes gestacional. Esse tipo de diabetes é resultante de uma tolerância diminuída aos carboidratos, e a hiperglicemia pode trazer complicações tanto para a gestante como para o desenvolvimento e crescimento do feto (JACOB et al., 2014; OLIVEIRA; MELO; PEREIRA, 2016). Nessa condição, os altos níveis glicêmicos maternos podem persistir ou não após parto, e caso persista, determina-se um quadro posterior de DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; BUCHANAN et al., 2007; GROSS et al., 2002).

Na categoria de outros tipos específicos de diabetes estão presentes as formas menos frequentes da doença e compreendem o DM ocasionado por: defeitos genéticos na função das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, e também aqueles induzidos por drogas ou produtos químicos e alguns tipos de infecções (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; GROSS et al., 2002).

### **2.1.2. Sinais clínicos e diagnóstico**

Apesar de alguns portadores de diabetes apresentarem um quadro inicialmente assintomático, normalmente, a hiperglicemia pode ser detectada através de sintomas clássicos que incluem: polidipsia (aumento da ingestão de líquido); poliúria (caracterizada pela excreção urinária aumentada); polifagia (aumento na ingestão de alimentos); e a perda de peso inesperada, no diabetes tipo 1, em consequência das alterações bioquímicas e falta de

insulina, que não permite a sua utilização para os processos anabólicos e manutenção dos músculos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; DIAS; SOARES; RESENDE, 2001; WAJCHENBERG, 1992). Além disso, outros sintomas também podem ser relevantes e caracterizados pela fadiga, fraqueza, letargia, prurido cutâneo e infecções repetidas (JACOB et al., 2014).

Os critérios para o diagnóstico do DM mudaram com o passar dos anos e os mais recentes foram definidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e aceitos pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Dessa forma, para diagnosticar o paciente portador de diabetes são avaliados os níveis de glicemia em jejum ( $\geq 126$  mg/dL); glicemia de 2 horas após o teste de tolerância à glicose (TTG) ( $\geq 200$ mg/dL); e os valores de hemoglobina glicada (HbA1c) ( $\geq 6.5\%$ ) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). (Tabela 1).

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos para portadores de pré-diabetes e diabetes mellitus.

| Exame   | Normal | Pré-diabetes   | Diabetes   |
|---|--------|----------------|------------|
| Glicemia de jejum (mg/dL)                             | <100   | 100 $\geq$ 125 | $\geq 126$ |
| Glicemia 2 horas após TTG com 75 g de glicose (mg/dL) | <140   | 140 $\geq$ 199 | $\geq 200$ |
| Hemoglobina glicada (%)                               | <5.7   | 5.7 $\geq$ 6.4 | $\geq 6.5$ |

\*Teste de tolerância à glicose (TTG). Adaptada de SBD, 2017.

### 2.1.3. Complicações decorrentes do Diabetes Mellitus

As consequências da hiperglicemia para o portador do diabetes são variadas e compreendem as complicações agudas e crônicas. As agudas são as emergências clínicas identificadas e tratadas rapidamente (COBAS; GOMES, 2010), enquanto que as complicações crônicas demandam rastreamento e acompanhamento a longo prazo.

Dentre as complicações agudas, a mais comum é a cetoacidose diabética (CAD), que pode se manifestar por falta no uso da insulina ou algum tipo de

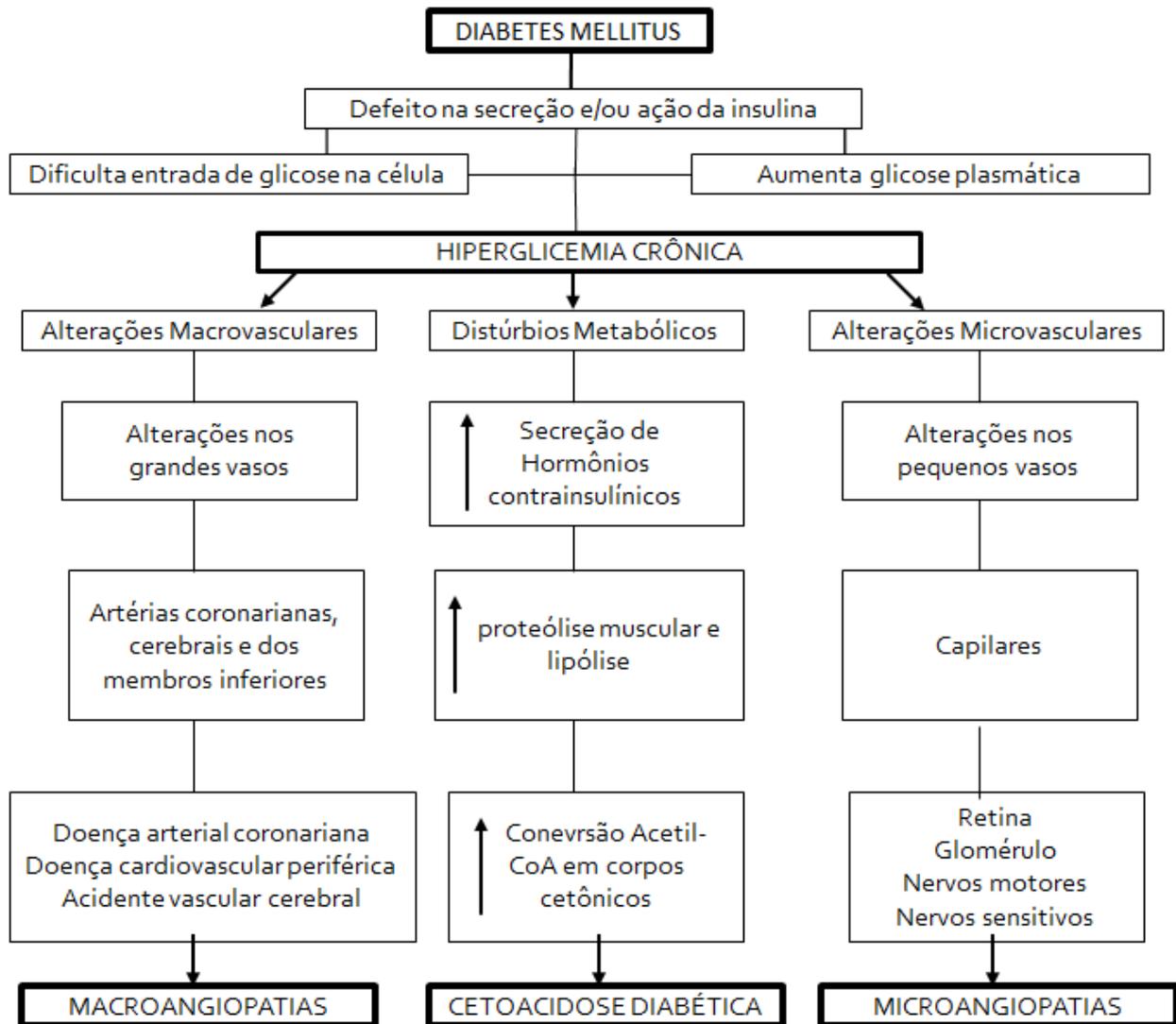
estresse agudo como infecções ou traumas (COBAS; GOMES, 2010; JACOB et al., 2014). A CAD é uma condição muito mais frequente em portadores do DMT1 e muitas vezes é a primeira forma de manifestação da doença (DHATARIYA; UMPIERREZ, 2017).

Uma vez que ocorre a redução dos níveis de insulina e aumento de hormônios contrarreguladores como cortisol e glucagon, o organismo passa a não utilizar adequadamente a glicose e a fonte de energia requerida é o lipídeo (COBAS; GOMES, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Sendo assim, a lipólise que ocorre no fígado leva ao aumento nos níveis de corpos cetônicos no plasma, com conseqüente redução do pH sanguíneo, o que caracteriza o quadro de cetoacidose e a presença de sintomas como dor abdominal, náuseas e vômitos (FERRAN; PAIVA, 2017; FOSS-FREITAS; FOSS, 2003; SIDDIQUI et al., 2013).

Além da complicação supracitada, também pode ocorrer crises hiperglicêmicas agudas (estado hiperglicêmico hiperosmolar) e hipoglicemias. A primeira, normalmente se manifesta em portadores do DMT2, apresenta aumento acentuado na glicose plasmática (600 mg/dL) e desidratação, enquanto que as hipoglicemias são mais comuns em diabéticos tratados com insulina ou sulfanilureias, levando a apresentação de sintomas como cefaleia, sensação de fome, taquicardia, tremores, sudorese e em casos mais graves, mudanças de comportamento, coma e até mesmo o óbito (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A exposição crônica a hiperglicemia do diabetes causa as alterações macro e microvasculares, levando ao acometimento de diversos órgãos e afetando diretamente a qualidade de vida dos seus portadores (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; CORIGLIANO et al., 2006; LAGRANHA et al., 2007; MEHMET et al., 2008; SALIDO et al., 2013). A nível macrovascular, ocorre o desenvolvimento de cardiopatias, doença cerebrovascular e doença vascular periférica, que estão principalmente relacionados com o aumento da pressão arterial sistêmica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; DHATARIYA; UMPIERREZ, 2017; LAGRANHA et al., 2007). Já os danos microvasculares incluem lesões nos rins, retina e nervos sendo responsáveis,

respectivamente, pela nefropatia, retinopatia e neuropatia diabéticas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; GROSS et al., 2002). (Figura 1).



**Figura 1.** Hiperglicemia crônica e as complicações decorrentes do DM. Adaptado de Ferreira et al. 2011.

#### 2.1.4. Modelo experimental do Diabetes Mellitus

Ao longo dos anos, o modelo animal vem sendo extensamente utilizado tanto para o entendimento dos mecanismos patológicos, quanto na busca de terapias para as complicações consequentes desse distúrbio endócrino-

metabólico (HOWARTH et al., 2017; KING, 2012; REES; ALCOLADO, 2005). A indução experimental do DM normalmente é feita através da administração de estreptozotocina (STZ), um antibiótico inicialmente isolado de *Streptomyces achromogenes* e utilizado para o tratamento de tumores pancreáticos e neuroendócrinos (GARZA-RODEA et al., 2010; SHARMA et al., 2013).

As doses e vias de aplicação da STZ são bem variadas, mas as administrações mais comuns ocorrem por via intraperitoneal (IP) e intravenosa (IV) (caudal, jugular e peniana) (CALÁBRIA et al., 2013; MOSTAFAVINIA et al., 2016). Já as concentrações utilizadas dependem do peso animal e tipo de diabetes que se deseja obter (FURMAN, 2016). Sendo assim, no caso do DMT1, em ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), doses variando de 45-60 mg/kg produzem hiperglicemia compatível com o quadro diabético e valores médios de glicemia plasmática em torno de 400 mg/dL (HOWARTH et al., 2017).

Os mecanismos para a ação diabetogênica desta droga ainda não estão totalmente esclarecidos. Mas, diversos estudos tem proposto que, por se tratar de uma molécula análoga a glicose, a STZ tem o seu importe para a célula beta pancreática através dos receptores de glicose tipo GLUT 2 (DEEDS et al., 2011; HOWARTH et al., 2017; KISHORE; KAJAL; KAUR, 2017). Dessa forma, uma vez internalizada, a molécula citotóxica pode causar danos irreversíveis ao DNA, através de fragmentação e apoptose, assim como pode envolver mecanismos como alquilação e a produção de óxido nítrico (ON), levando a uma consequente redução na síntese e liberação de insulina (DEEDS et al.2011; KISHORE; KAJAL; KAUR, 2017).

Com isso, em roedores, a STZ promove danos semelhantes aos provocados pelo DMT1 em humanos, caracterizando quadros como hiperglicemia, polidipsia, poliúria e polifagia, acompanhado de perda de peso, níveis reduzidos de insulina plasmática e até mesmo presença de hiperlipidemia (AKBARZABEH et al., 2007; HOWARTH et al., 2017). Além disso, diversas pesquisas vem utilizando esse modelo para avaliar as alterações específicas resultantes do diabetes no tecido hepático (MOHAMED et al., 2016), cardíaco (LAWSON et al., 2018), retina (SZABÓ et al., 2017),

nervos (MEHTA; NERKAR; BANERJEE, 2017) e também nos rins (FERNANDES et al., 2016).

## 2.2 NEFROPATIA DIABÉTICA

### 2.2.1. Definição, progressão e diagnóstico

A nefropatia diabética (ND) ou doença renal diabética (DRD), é uma síndrome caracterizada por aumento na excreção urinária de albumina, lesões glomerulares e redução na taxa de filtração glomerular (LIM, 2014; SILVA; MENG; COENTRÃO, 2017). Muito associada ao aumento da pressão arterial sistêmica, que pode acelerar a lesão nos rins, afeta aproximadamente 30-50% dos portadores de DM e é considerada a principal causa de insuficiência renal crônica (IRC) e indicação para diálise e transplante em todo o mundo (BERMEJO; PASCUAL; SOLER, 2017; PERSSON; ROSSING, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

Diversos são os fatores de risco envolvidos na gênese e progressão da ND, mas acredita-se que características como a predisposição genética, idade, duração do diabetes e as disfunções hemodinâmicas estejam relacionadas. Além disso, alterações metabólicas como obesidade, hiperlipidemia e principalmente a hiperglicemia, parecem responsáveis por desencadear o mecanismo de lesão renal (BENNETT; ADITYA, 2015; SILVA; FRAGOSO; NEVES, 2014; MENG; COENTRÃO, 2017; UMANATH; LEWIS, 2018).

A nefropatia diabética apresenta 5 estágios clínicos, definidos a partir da excreção urinária de albumina (EUA), taxa de filtração glomerular (TFG) e pressão arterial sistêmica (PAS) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Em humanos, primeiramente ocorre hiperfiltração nos glomérulos e nefromegalia, o que pode ser acompanhado ou não pelo aumento da PAS. Sem a apresentação de outros sintomas clínicos e com a EUA dentro dos valores normais, essa fase é identificada como A1 ou albuminúria normal (<30 mg/dia e TFG>90 mL/min//1.73 m<sup>2</sup>). Em sequência, é caracterizada a fase A2 ou também definida como albuminúria aumentada, onde os valores da excreção de albumina

apresentam um acréscimo (>30 mg/dia), assim como os níveis pressóricos. Nessa fase, já é possível identificar redução na TFG (60-89 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) e alterações na estrutura renal, como expansão da matriz extracelular e espessamento da membrana mesangial (CHEN; KHURY; ZIYADEH, 2013). Posteriormente, na terceira fase clínica, valores de EUA acima de 300mg/dia são identificados, o que caracteriza a fase A3 ou de albuminúria persistente. Nesse momento, a redução da TFG é cada vez mais evidente e classificada com uma redução moderada (30-59 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>), enquanto a pressão arterial apresenta-se elevada.

As fases finais da progressão da doença incluem os estágios mais graves da lesão renal diabética, com alterações irreversíveis, onde no 4º estágio clínico é observada a insuficiência renal crônica e uma redução grave na TFG (<30ml/min/1.73 m<sup>2</sup>), que por fim, leva um quadro de diálise (TFG<15 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>), ambos acompanhados por hipertensão arterial (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017; HANEDA et al., 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). (Tabela 2).

**Tabela 2.** Estágios clínicos da nefropatia diabética.

| Estágio                               | EUA          | TFG   | PAS       |
|---------------------------------------|--------------|---|-----------|
| <b>1.Albuminúria normal (A1)</b>      | <30mg/dia    | Normal ou aumentada (≥90 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )   | Normal    |
| <b>2.Albuminúria aumentada (A2)</b>   | 30-300mg/dia | Leve diminuição (60-89 mL/min/ 1.73 m <sup>2</sup> )    | Crescente |
| <b>3.Albuminúria persistente (A3)</b> | >300mg/dia   | Moderada diminuição (30-59 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> ) | Alta      |
| <b>4.IRC</b>                          | Alta         | Grave diminuição (15-29 mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )    | Alta      |
| <b>5.Diálise</b>                      | Abundante    | <15 mL/min/1.73 m <sup>2</sup>                          | Alta      |

\*Excreção de albumina urinária (EUA); \*Taxa de filtração glomerular (TFG); \*Pressão arterial sistêmica (PAS); \*Insuficiência renal crônica (IRC). Adaptada de SBD, 2017. ADA, 2018. HANEDA et al., 2015.

Para o diagnóstico clínico da ND, como já mencionado, a principal característica bioquímica é a quantificação da albumina urinária. Porém, outras formas de avaliação são utilizadas e estudadas como reforço prognóstico.

Junto com a albumina, os valores da creatinina sérica e urinária (*clearance* de creatinina) também são considerados, pois, a excreção e níveis anormais desta é indicativa da lesão renal e o seu aumento acompanha a progressão dos estágios clínicos da ND. Mas, apesar de ser útil para estimar a TFG, a creatinina não deve ser considerada de maneira isolada, uma vez que pode ser alterada por outros fatores, como lesão da massa muscular e aumento na ingestão de proteínas (MURUSSI et al., 2008; SHAH; BJORNSTAD; JOHNSON, 2016).

Além destes e das biópsias renais, outros marcadores de disfunções glomerulares tem sido avaliados, como a excreção de Cistatina C, ácido úrico, transferrina, ceruloplastina, laminina, adiponectina, nefrina e proteínas podócitárias (JHA; JANDELEIT-DAHM; COOPER, 2014; ZHANG; LIU; QIN, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Atrelado a isso, atualmente, também é rastreada a existência de retinopatia diabética (RD) que parece estar associada ao surgimento da ND, por mecanismos ainda não esclarecidos (UMANATAH; LEWIS, 2018).

Por se tratar de uma doença crônica, o desenvolvimento da lesão renal até o seu último estágio, em diabéticos do tipo 1, normalmente pode levar até 30 anos. Mas, o acompanhamento deve ser iniciado 5 anos após a detecção do DM e indica-se que o rastreio da presença de albuminúria e a estimativa da TFG seja de maneira anual (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017).

### 2.3. FISIOPATOLOGIA DA NEFROPATIA DIABÉTICA

Os mecanismos fisiopatológicos da ND ainda não foram totalmente compreendidos, porém, acredita-se que fatores como o aumento do estresse oxidativo (EO) e das espécies reativas de oxigênio (EROS), bem como a produção e acúmulo dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), citocinas inflamatórias, alterações hemodinâmicas, estruturais e metabólicas estejam diretamente associadas com a hiperglicemia e as alterações renais.

### 2.3.1. Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo

Os radicais livres são moléculas, íons ou grupos de moléculas consideradas instáveis por possuírem um ou mais elétrons não pareados em sua última camada orbital. Sendo derivados do metabolismo do oxigênio (EROS) ou do nitrogênio (ERNS), esses átomos podem ligar-se facilmente a diversas outras moléculas, por um processo conhecido como oxidação (VASCONCELOS et al., 2014; TELES et al., 2015).

A formação de radicais livres é um mecanismo fisiológico comum e, de todo o oxigênio metabolizado pelas mitocôndrias, cerca de 1-3% são convertidos a EROS (MATOUGH et al., 2012). Dessa forma, em condições normais, os radicais livres são muito importantes e estão envolvidos em diversos processos como a produção de energia, sinalização e crescimento celular, incluindo fagocitose, apoptose e síntese de diversas substâncias, inclusive de alguns hormônios (HIGASHI et al., 2014; TELES et al., 2015). Dentre estas espécies reativas estão o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), as hidroxilas ( $OH^{\cdot}$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), óxido nítrico (ON) e outros (FERREIRA et al., 2011; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

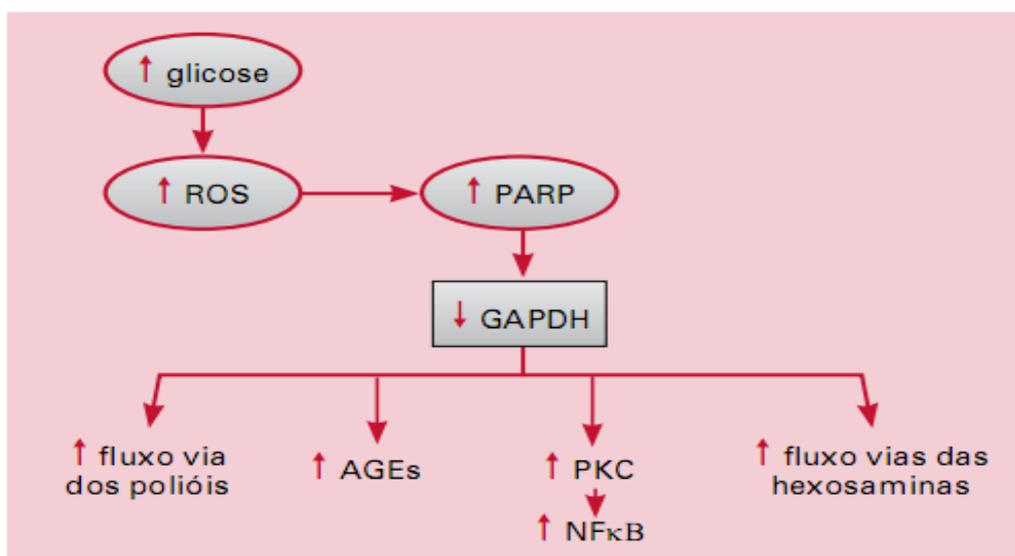
Para combater as EROS produzidas em condições fisiológicas, os organismos aeróbios utilizam de um processo muito bem coordenado, que inclui mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, caracterizando a defesa antioxidante. Esse mecanismo de defesa enzimático contra a ação das espécies reativas é composto por diversas enzimas como a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e as glutathionas peroxidase (GPx) e redutase (GPr). Já a defesa não enzimática é proveniente de antioxidantes externos, que podem ser obtidos através de alimentação ou suplementação, como é o caso das vitaminas A (retinol), E (tocoferol), C (ácido ascórbico), flavanóides e carotenoides (COLAK et al., 2017; NIMSE; PAL, 2015; TELES et al., 2015).

Apesar de ser um mecanismo bastante eficaz, algumas condições levam a uma síntese elevada das EROS e com isso, o nosso sistema de defesa não é suficiente para conter essa alta produção, caracterizando assim, um desequilíbrio entre os radicais livres e a capacidade antioxidante, levando a

uma condição conhecida como estresse oxidativo (MIRANDA-DÍAZ et al., 2016; CAMPOS; LEME, 2017).

Os danos oxidativos, consequentes deste desequilíbrio, podem causar alterações diretas e funcionais em diversas moléculas como os lipídios, DNA, proteínas e carboidratos (ONDEI; TERESA; BONINI-DOMINGOS, 2014). Além disso, tem sido amplamente associados ao desenvolvimento de diversos processos patológicos como o câncer, as doenças autoimunes, neurodegenerativas, cardiovasculares, síndrome metabólica e as complicações diabéticas (FRANCISQUETI et al., 2017; GIACCO; BROWNLEE, 2010; HIGASHI et al., 2014; PALMA et al., 2014).

A hiperglicemia é indicada como o principal fator determinante na gênese e progressão da ND, pois, diversas vias dependentes de glicose são ativadas no indivíduo diabético. O estresse oxidativo é considerado o mecanismo unificador de indução da lesão renal, que incluem uma superestimulação de diversas vias, como: via do polioliol, produtos finais de glicação avançada, proteína quinase C (PKC) e hexosaminas (REIS et al., 2008). (Figura 2).



**Figura 2.** Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia. Fonte: Reis, J. S. et al. (2008).

Os AGEs são produzidos em consequência a exposição ao excesso de glicose, através de glicosilação não enzimática. Primeiramente, a glicose se liga a proteínas por um processo não enzimático e que pode ser revertido,

denominada como base de Schiff e formando os produtos iniciais de glicação avançada (CASTRO et al., 2011). Com o tempo, essas moléculas podem se reorganizar, mudando sua estrutura e formar ligações irreversíveis (ligação de Amadori) com estruturas estáveis, passando a ser consideradas como produtos finais de glicação avançada. Esses AGEs podem acumular-se em diversos locais do tecido renal, como mesângio, podócitos, células glomerulares e também nos capilares, onde se ligam através de receptores específicos (RAGE). Um exemplo de ligação irreversível é a hemoglobina glicada (Hb1Ac), que tem relação direta com o desenvolvimento da ND e precisa ter seus níveis acompanhados e controlados nos portadores de hiperglicemia (ANNADURAI et al. 2014; CASTRO, 2011; FERREIRA et al., 2011; REIS et al., 2008).

Uma vez acumulados no tecido renal, os AGEs vão estimular a produção de mensageiros secundários como a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase ativadora da mitogênese (MAPK) e também do fator de transcrição nuclear (NF- $\kappa$ B). Juntas, essas vias levam a uma elevada liberação de fatores de crescimento e inflamatórios, como o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), alterando cada vez mais a estrutura e a fisiologia renal (CASTRO, 2011; FERREIRA et al., 2011; REIS et al., 2008).

A via do poliol também está ativada na ND. Nesse caso, a glicose é convertida a sorbitol através da atividade da enzima aldose redutase. O aumento desse fluxo, induzido pelas EROS, possivelmente leva a uma conversão aumentada de glicose a sorbitol, que pode acumular no tecido renal, o que conseqüentemente reduz as atividades da NADPH e da glutatona. Posteriormente, o sorbitol é convertido à frutose, o que aumenta a síntese de diacilglicerol (DAG), e é considerada a principal via responsável por ativar a PKC (FERREIRA et al., 2011; REIS et al., 2008).

Outro mecanismo responsável pelas modificações decorrentes das EROS é a via das hexosaminas. Na superativação dessa via, a glicose é convertida em frutose- 6-fosfato e esta será transformada em N-acetilglicosamina-6-fosfato. A sua conversão em UDP-N-acetilglicosamina resulta em alterações patológicas

na expressão gênica, aumentando produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (REIS et al., 2008).

O estresse oxidativo leva a muitas consequências para o organismo e uma das mais estudadas é a peroxidação lipídica. Frequentemente associada com a produção do radical peroxila, a lipoperoxidação é definida como uma cascata de eventos bioquímicos, resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares. Dessa forma, a ativação desse mecanismo leva a alteração nas membranas, afetando diretamente a sua estrutura, fluidez, permeabilidade e causando até mesmo a morte celular por apoptose (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LEITE; SARNI, 2003).

Para avaliação do dano causado pela peroxidação lipídica, o método mais utilizado é a mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e diversos estudos tem reportado o aumento desses níveis no tecido renal, tanto em portadores como em ratos induzidos ao diabetes. Junto a isso, também é avaliada a capacidade antioxidante através dos níveis da glutathiona (GSH), onde é muito observado a sua redução, caracterizando esse desequilíbrio resultante da hiperglicemia (ANNADURAI et al., 2014; MAHMOONDIA et al., 2017; MIRANDA-DÍAZ et al., 2016; MODARES; NAFAR; SAHRAEI, 2017).

### **2.3.2. Alterações hemodinâmicas**

Portadores de diabetes frequentemente apresentam modificações hemodinâmicas, caracterizadas por disfunções cardíacas e vasculares, como arritmias, quadros de insuficiência cardíaca, fibrilação ventricular e hipertensão, normalmente relacionados ao estresse oxidativo (CINAR et al., 2001; NAKOU; MAVRAKIS; VARDAS, 2012; PASKALOGHU; SENER; AYANGOLU-DULGER; 2004).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) associada ao DM é relatada por acelerar a lesão glomerular e aumentar o risco de desenvolvimento da doença renal crônica (DRC) (USRDS, 2007), ocasionando aumento na excreção de albumina e espessura da membrana basal glomerular (COOPER, 2001).

Clinicamente, a redução na pressão arterial parece ser a mais simples e eficiente intervenção para retardar a progressão da nefropatia diabética (GIUNTI et al., 2006), pois, pacientes diabéticos com pressão correspondente a 130/80 mmHg raramente desenvolvem macroalbuminúria e demonstram declínio na taxa de filtração glomerular (TFG) semelhante ao observado em pessoas saudáveis. Por outro lado, diabéticos com pressão arterial em torno de 140/90 mmHg apresentam declínio mais acentuado na TFG e cerca de 30% desenvolvem macroalbuminúria e proteinúria (GIUNTI et al., 2006).

A disfunção endotelial também pode ser observada em modelo experimental de diabetes e acredita-se que seja decorrente de condições como menor síntese e liberação de óxido nítrico, menor resposta da musculatura lisa aos fatores de relaxamento ou inativação destes por radicais livres, junto a produção aumentada de fatores vasoconstritores e inflamatórios (SUGANYA et al., 2016; YEOM; BYEON; LEE, 2016). Uma vez que os sistemas antioxidantes são menos efetivos no diabetes, as EROS são relacionadas com a disfunção endotelial induzida pela hiperglicemia. Assim, a vasculatura de diabéticos seria alvo dos radicais livres, seja por meio de redução do estado antioxidante celular ou maior suscetibilidade a auto-oxidação da glicose e oxidação de colesterol, como o LDL (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000; SELIGMAN; CLAUSELL, 1999; TODA; IMAMIRA; OKAMURA, 2010).

A melhora na vasodilatação endotelial tem sido relacionada, por muitos autores, à ação de antioxidantes endógenos e/ou exógenos. Com o uso de antioxidante exógeno, é relatado que a administração de vitamina C e flavanóides apresentam efeitos vasodilatadores no quadro diabético (DAL; SIGRIST, 2016; SELIGMAN; CLAUSELL, 1999; SUGANYA et al., 2016).

Da mesma forma, a melatonina, também amplamente utilizada de maneira exógena, é responsável por apresentar eficiência nas complicações vasculares do diabetes, protegendo a pressão arterial sistólica e diastólica no modelo experimental e em pacientes com síndrome metabólica (KLIMENTOVA et al., 2016; KORIZÓG et al., 2010), assim como melhora a resposta vascular em ratos diabéticos e portadores da hiperglicemia crônica com quadro de hipertensão (KATSI et al., 2012; MOZDZAN et al., 2014; REYES-TOSO et al., 2002; SIMKO; PAULIS; SUDNIKOVICH et al., 2007).

### 2.3.3. Alterações estruturais

Primariamente, acreditava-se que as alterações estruturais nos rins aconteciam apenas no glomérulo renal. De fato, o glomérulo é uma estrutura diretamente afetada, por ser grande responsável pelo mecanismo de filtração, porém, outras regiões também sofrem danos, como as células mesangiais, podócitos, barreira de filtração glomerular e os túbulos renais (FERREIRA et al., 2011; HABIB, 2013; SALGADO et al., 2004).

As células mesangiais apresentam importante papel na estrutura e manutenção da função fisiológica dos glomérulos. Nessas células, assim como na maioria das células do corpo, a glicose entra pelo mecanismo de difusão facilitada, através de proteínas integrais de membrana específicas, os transportadores de glicose (GLUTs) (LAGRANHA et al., 2007). Estudos com células mesangiais *in vitro* demonstram maior expressão de GLUT1 em meios com alta concentração de glicose, maior atividade da PKC e consequente estímulo à síntese de proteínas da matriz extracelular. Em consequência a isso, na ND é ativada a síntese de diversas proteínas da matriz extracelular como fibronectina, laminina, tenascina e colágeno. Essas proteínas modificam a matriz mesangial e levam a formação do glomérulo esclerótico, caracterizado por espessamento da membrana basal e proliferação mesangial (FERREIRA et al., 2011; LAGRANHA et al., 2007). Além disso, também é frequentemente observada a fibrose intersticial (BIEKE et al., 2004; COOPER, 2001; GUIMARÃES-SOUZA et al., 2015; ROCCO et al. 1992; ZHOU et al., 2004).

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

papel essencial no desenvolvimento da ND (MARSHALL, 2007; REDDY et al., 2008; WOLF; ZIYADEH; 2008).

A causa exata da perda de podócitos no DM permanece especulativa. Porém, pesquisas com cultura dessas células expostas a altas concentrações de glicose e em modelos experimentais de diabetes indicam a apoptose como o principal mecanismo celular da depleção de podócitos na progressão da nefropatia diabética (EID et al., 2009; MENINI et al., 2007; NIRANJAN et al., 2008; SUSZTAK; RAFF; SCHIFFER, 2006; SZABÓ et al., 2006). No entanto, ainda são observadas controvérsias se a apoptose podocitária ocorre de maneira precoce (SUSZTAK; RAFF; SCHIFFER, 2006) ou tardia (MENINI et al., 2007) no curso da lesão renal diabética.

Estudos apontam que a apoptose presente na ND é consequente a hiperglicemia, pois, alta glicose e angiotensina II (ANG II) induzem morte celular em cultura de podócitos, mediada pela ação de TGF- $\beta$  (DING et al., 2002; SCHIFFER et al., 2001). Junto a isso, também há evidências de que a formação de AGEs, EROS e a ativação de NF-kB contribuem para apoptose de podócitos tanto *in vitro* como *in vivo* (MENINI et al., 2007; PESCHKE et al., 2002; SUSZTAK; RAFF; SCHIFFER, 2006; SZABÓ et al., 2006). Além disso, outro mecanismo também pode ser responsável pela perda podocitária na ND, como o destacamento destas células da membrana basal glomerular, processo já observado experimentalmente, porém, os mecanismos ainda não esclarecidos (PETERMAN et al., 2003).

#### **2.3.4. Citocinas inflamatórias**

As citocinas consistem em um grupo de polipeptídeos de baixo peso molecular, que possuem efeitos autócrinos e parácrinos. São produzidas por uma variedade de células do organismo e desempenham papéis importantes em muitas respostas fisiológicas (CREWS et al., 2006; VIANNA et al., 2011).

Estas moléculas são divididas em várias classes, como as interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral, interferons, fatores estimuladores de colônia, fatores transformantes de crescimento e quimiocinas, as quais fazem parte de uma rede reguladora da resposta inflamatória e imune altamente complexa e

coordenada, que envolve a participação de diferentes vias de sinalização (CREWS et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

Muitos estudos tem buscado compreender os mecanismos da ND e foi demonstrado que os fatores inflamatórios estão diretamente envolvidos na ativação e progressão da nefropatia diabética, principalmente através de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (VIANNA et al., 2011).

A IL-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória produzida por diversas células, incluindo células endoteliais, linfócitos T, monócitos, fibroblastos e células mesangiais (SOUZA et al., 2008; CARVALHO; DOMINGUETI, 2016). Esta molécula induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos, a proliferação de linfócitos T e a produção de proteínas de fase aguda, como proteína C-reativa (PCR) e fibrinogênio. Além disso, esta citocina estimula a proliferação de células renais mesangiais e exerce papel fundamental na nefropatia proliferativa mesangial. Níveis elevados de IL-6 estão associados com a hipertrofia renal e o espessamento da membrana basal glomerular em pacientes diabéticos (CARVALHO; DOMINGUETI, 2016).

O TNF- $\alpha$  também é uma citocina pró-inflamatória e que atua na regulação, diferenciação e proliferação celular, no processo de apoptose e estimulando outras citocinas inflamatórias (VIANNA et al., 2011). Com isso, os efeitos do TNF- $\alpha$  na patogênese da ND incluem a estimulação da produção de matriz extracelular, a indução de apoptose das células musculares lisas vasculares (através de vias autócrina ou direta) e estimulação da produção de prostaglandinas pelas células mesangiais, onde todos esses fatores contribuem para alterar o fluxo sanguíneo renal. Além disso, o TNF- $\alpha$  também é capaz de induzir a produção de EROS pelas células glomerulares renais, as quais são bastante lesivas para os glomérulos, resultando na alteração da função de barreira de filtração glomerular e fibrose intersticial muito bem documentas em portadores e também em modelos experimentais da ND (CARVALHO; DOMINGUETI, 2016; COLAK et al., 2017; VIANNA et al., 2011).

## 2.4. TRATAMENTOS PARA A NEFROPATIA DIABÉTICA

As buscas por um tratamento que venha minimizar os danos decorrentes da nefropatia diabética são cada vez maiores. Porém, até o momento, as medidas adotadas para evitar os danos renais são basicamente as mesmas utilizadas para conter as outras alterações microvasculares diabéticas, através de intervenções medicamentosas e não medicamentosas (BALAKUMAR et al., 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

A intervenção não medicamentosa inclui a mudança de hábitos alimentares e a prática de atividades físicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2017). Já para o tratamento medicamentoso é baseado no uso de hipoglicemiantes orais, como a metformina, sulfaniluréias e glibenclamida para os diabéticos do tipo 2, enquanto que os portadores de diabetes do tipo 1, recorrem a insulino terapia, que ainda é a principal forma para conter a hiperglicemia e as complicações decorrentes deste quadro (PIRES; CHACRA, 2008). Além disso, também é amplamente utilizado fármacos que exerçam efeitos diretamente no controle da pressão arterial sistêmica, como os controladores do sistema-renina-angiotensina (SRA) que estão intimamente relacionados com o aumento da EUA e desenvolvimento da ND (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017).

### 2.4.1. Insulina

A insulina, descoberta em 1921, é um hormônio anabólico produzido pelas células beta pancreáticas e responsável por regular o metabolismo da glicose (PIRES; CHACRA, 2008). Principalmente utilizada como reposição hormonal para o tratamento de portadores de DMT1, e quando necessário, auxiliando no controle glicêmico em quadros de DMT2, também pode ser utilizada em casos de lesões severas e até mesmo câncer (MARTINEZ-RIQUELME; ALLISON; 2003; SALTIEL; KAHN, 2002).

A ação da insulina ocorre através da ativação de seus receptores e com isso, ela é responsável por atuar diretamente em órgãos como o fígado, músculo liso e tecido adiposo, promovendo a síntese e armazenamento de

carboidratos, lipídios e proteínas, além de inibir a quebra e liberação dos mesmos para a corrente sanguínea (SALTIEL; KAHN, 2002).

Atualmente, a reposição hormonal com a insulina visa manter os valores glicêmicos mais próximos possíveis dos níveis fisiológicos, através de um tratamento individualizado e evitando-se tanto sequelas de hipoglicemias quanto alterações no sistema nervoso central, que podem ser decorrentes de quadros alternados de hiperglicemias com hipoglicemias (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2017). Sendo assim, a Sociedade Brasileira de diabetes sugere valores de referência para a glicemia em pessoas com tratamento insulínico. (Tabela 3).

**Tabela 3.** Metas glicêmicas para insulino terapia.

|                        | <b>Glicemia pré-prandial</b> | <b>Glicemia pós-prandial</b> | <b>Glicemia ao deitar</b> | <b>Glicemia de madrugada</b> | <b>HbA1c</b> |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------|
| <b>Todas as idades</b> | 90-145 mg/dL                 | 90-180 mg/dL                 | 120-180 mg/dL             | 80-162mg/dL                  | 7,5%         |

\*Adaptado de SBD, 2017.

Em pacientes com glicemia desregulada, como já mencionado, a microcirculação renal é constantemente exposta à níveis elevados de glicose, e este fato resulta em muitas alterações estruturais e funcionais (FERREIRA et al., 2011).

Dessa forma, não há dúvida de que um tratamento com insulina de maneira adequada é absolutamente necessário para se obter bons resultados no tratamento do diabetes, no entanto, uma metodologia detalhada e bem fundamentada é necessária (PINHEIRO et al., 2011), visto que todas as abordagens terapêuticas ainda não são capazes de evitar as alterações do diabetes induzidas nos tecidos.

No entanto, visando um controle glicêmico mais eficaz, tem sido proposto o tratamento com a insulina de forma intensiva e alguns autores tem observado os efeitos adversos dessa utilização (CLAIN; RAMAR; SURANI, 2015; SCHIMMER, 2015; TIEMESSEN et al., 2011). A superinsulinização pode levar ao desenvolvimento de hipoglicemia, resistência à insulina (RI), aumento do risco de doenças cardiovasculares e ganho de peso corporal. Além disso, o uso

de insulina injetada predispõe à inflamação, aterosclerose, hipertensão, dislipidemia, insuficiência cardíaca (IC) e arritmias (BERGHE et al., 2001; HERMAN et al., 2017; ISMAILOV; VODOVSKAY, 2018; PRYIA; KALRA, 2018).

Diante dessa questão, alguns estudos tem buscado compreender os efeitos de substâncias antioxidantes, como a melatonina, frente as complicações vasculares diabéticas, que são consequentes a exposição à insulina, por se tratar de uma condição amplamente associada aos efeitos deletérios da hiperglicemia sobre os rins e também outros órgãos, como o fígado.

## 2.5. MELATONINA

### 2.5.1. Características gerais e mecanismo de ação

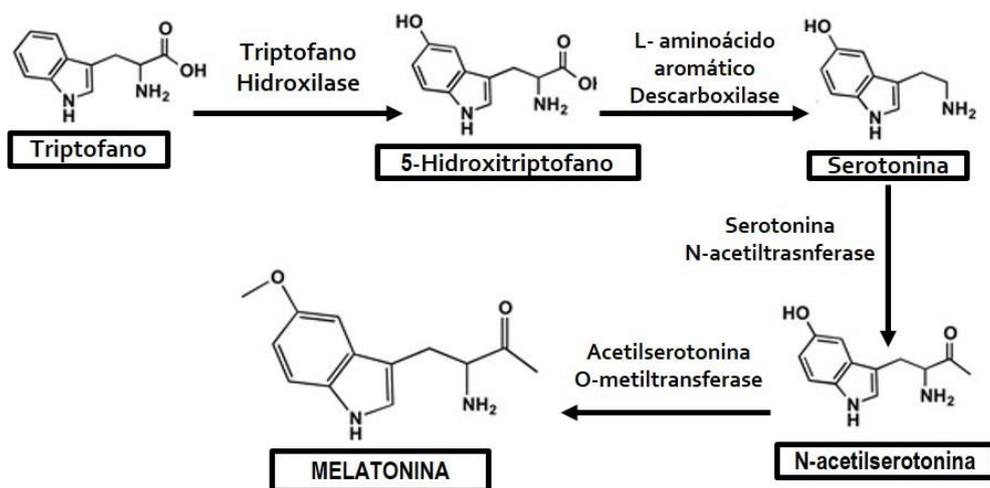
A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) (MLT) é um hormônio pertencente a classe das indolaminas e sintetizado, principalmente, pela glândula pineal (EGHBAL et al., 2016; REITER; TAN; GALANO, 2014). Nesta glândula, que fica localizada no sistema nervoso central (SNC), existem células intersticiais, semelhantes as células da glia e tipos celulares especializados, os pinealócitos, que são responsáveis pela síntese da melatonina e de outras biomoléculas (MAGANHIN et al., 2008; HISSA et al., 2008; STEHLE et al., 2011; TAMURA, 2008).

Nos vertebrados, como por exemplo em humanos, esse hormônio está diretamente relacionado com a percepção do ciclo de iluminação ambiental, uma vez que os seus níveis são mínimos durante o dia (5-20 pg/mL) e apresentam pico de produção durante a noite, onde a concentração sanguínea aumenta aproximadamente 10 vezes (80-150 pg/mL) (ARENDDT; SKENE, 2005; HIRIART et al., 2012; MAITRA; BAIDYA; KHANNA et al., 2013). Dessa forma, é reconhecido como o agente endógeno da escuridão, controlando o ritmo circadiano e diversos outros processos celulares, neuroendócrinos e neurofisiológicos, incluindo atividades imunomoduladoras, anti-apoptóticas, oncostáticas, sobre a frequência cardíaca e processo inflamatório (AMBALDHAGE et al., 2016; AMIM; EL-MISSIRY; OTHAM, 2015; CARRILLO-

VICO et al., 2004; HIRIART et al., 2012; MILLER et al., 2006; REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010).

O ritmo de produção diário da MLT é basicamente controlado pela retina, já que essa estrutura é responsável pela percepção da luminosidade através de fotorreceptores como os cones e os bastonetes. Com isso, os impulsos nervosos percebidos por tais componentes são enviados aos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) e núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), através do eixo retino-hipotalâmico, de onde seguem para os gânglios cervicais superiores e a informação chega, finalmente, até a glândula pineal (DOMINGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2009; HIRIART et al., 2012; MAHMOOD et al., 2016).

A biossíntese da MLT ocorre a partir do aminoácido triptofano e envolve, principalmente, a atuação de 4 enzimas: triptofano-hidroxilase, 5-hidroxitriptofano descarboxilase, N-acetiltransferase e hidroxindol-O-metiltransferase (GARCÍA et al., 2014). Primeiramente, ocorre a hidroxilação do triptofano pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), formando o composto 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Em seguida, a enzima 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) retira o grupo alfa-carboxil terminal do 5-HTP convertendo-o em serotonina. Após, ocorre uma reação catalisadora pela enzima N-acetiltransferase (NAT) que faz a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). E, por fim, chega a etapa de oximetilação, onde a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em melatonina (CARPENTIERI et al., 2012; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005; DUBOCOVICH, 2003; MACCHI, 2004; MARONDE et al., 2011; REITER; TAN; FUENTES-BROTO, 2010). Vale salientar que a produção da enzima HIOMT, ocorre exclusivamente no período de ausência de luz, sendo considerada a etapa limitante para a formação da MLT (MAGANHIN et al., 2008; PEKELMANN et al., 2003; ZIELINSKA et al. 2016) (Figura 3).



**Figura 3.** Via metabólica da síntese de melatonina. Fonte: Adaptado de Carpentieri et al. (2012).

Uma vez produzida na glândula pineal, a melatonina não é armazenada, sendo então rapidamente liberada no líquido cefalorraquidiano e na corrente sanguínea, onde é transportada aos tecidos-alvos e aos mais diversos compartimentos celulares principalmente associada à albumina (70%), ou também em sua forma livre (30%) (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014; MAITRA; BAIDYA; KHANNA et al., 2013; TAKE, 2009; VIJAYALAXMI, 2004). Apresentando baixo peso molecular e toxicidade, essa indolamina é reconhecida como uma molécula anfifílica, devido a sua composição estrutural, que apresenta dois grupos funcionais, os resíduos O-metil e N-acetil, conferindo a esse composto, propriedade de difundir-se em meios hidro e lipossolúveis (CARPENTIERI et al., 2012; SOUZA; MORAIS, 2016).

O tempo de vida médio da MLT circulante é de aproximadamente 30 à 50 minutos e para a metabolização desse hormônio, são reconhecidas duas vias principais, que ocorrem no cérebro e no fígado (MANGAHIN et al., 2008; MAITRA; BAIDYA; KHANNA et al., 2013). No tecido cerebral, a melatonina é convertida aos metabólitos N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxiquinuramina (AMFK) e N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (ALMEIDA et al., 2016; DUBOCOVICH et al., 2010; ZLOTOS et al., 2014). Já a cascata metabólica que ocorre no tecido hepático, considerada a via clássica, envolve a ação de enzimas do citocromo P450, que através de hidroxilação, formam a 6-hidroxi melatonina. Posteriormente, este composto é conjugado a sulfatos ou glucoronidas, formando o metabólito 6-sulfatoximelatonina, que por fim, é excretado na urina

e reflete diretamente os níveis da melatonina produzida pela pineal (CIPOLLANETO; AFACHE, 2008; DUBOCOVICH et al., 2010; MA et al., 2008; SLOMINSKI et al., 2012).

Após a sua descoberta na década de 50 (LERNER et al., 1958) e durante muitos anos, acreditou-se que a produção desse hormônio era exclusivamente realizada pela glândula pineal. No entanto, estudos posteriores observaram, em mamíferos, a presença de enzimas relacionadas à síntese da MLT em locais fora da pineal, como na retina e cerebelo. A partir disso, foi observado que diversos outros tecidos apresentam síntese própria do neurohormônio, e que nesses locais, a produção ocorre de forma independente ao ritmo circadiano e é de grande importância para ação autócrina e parácrina, atuando, por exemplo, contra a inflamação e danos oxidativos (HARDELAND, 2017; MAGANHIN et al., 2008).

A MLT exerce seus diversos efeitos biológicos de forma direta, como já mencionado, ou por interação com receptores de membrana. Atualmente, são conhecidos dois sítios de ligação para este hormônio, denominados MT1 e MT2, que são receptores de alta afinidade acoplados à proteína G (GPCR) (DUBOCOVICH, 1999; EMET et al., 2016; ZLOTOS et al., 2013).

Os dois subtipos de receptores podem ser encontrados em órgãos centrais e periféricos. Sendo assim, o MT1 é normalmente expresso no cérebro, fígado, rim, órgãos reprodutores, células do sistema imune, pâncreas e sistema cardiovascular (FAVERO et al., 2017; GONZÁLEZ-ARTO et al., 2017). Enquanto o subtipo MT2 é encontrado no SNC, hipotálamo, retina, vasos sanguíneos, rim, trato gastrointestinal, adipócitos e pele (FAVERO et al., 2017; SLOMININSK et al., 2012).

Além dos receptores supracitados, a indolamina também parece capaz de interagir com um terceiro sítio de ligação, o MT3. Por se tratar de um receptor de baixa afinidade à proteína G, pertence à família das enzimas redutases e é denominada como quinona redutase 2 (QR2). Apesar de não ter sido encontrado em humanos, o MT3 é bem expresso no fígado, rins, coração, tecido adiposo e cérebro de hamsters, estando envolvido no processo de detoxificação (EMET et al., 2016; FAVERO et al., 2017).

A interação da melatonina com esses receptores de membrana desencadeia vias de sinalizações diferentes dependendo do tecido alvo. Estudos *in vitro* demonstram que, por exemplo, em células  $\beta$  pancreáticas, a ligação com receptores MT1 leva à ativação da proteína G inibitória (Gi), resultando na redução da atividade da adenil-cicase e queda na produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), diminuindo a secreção de insulina (PESCHKE et al., 2000). No entanto, quando ligada aos receptores MT2, inibe a via da guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que também reduz a síntese de insulina (PESCHKE, 2008; STUMPF et al., 2008). Em contrapartida, através de uma terceira via de sinalização, envolvendo proteína Gq, fosfolipase C e inositol trifosfato (IP3), ocorre mobilização dos estoques intracelulares de cálcio e resulta em um aumento da liberação insulínica (BACH et al., 2005; PESCHKE; BACH; MUHLBAUER, 2006). Dessa forma, é possível evidenciar a influência da melatonina no metabolismo da glicose, proteínas e lipídeos, que são totalmente modificados no quadro diabético.

### **2.5.2. Capacidade antioxidante da melatonina e complicações diabéticas**

A melatonina é apontada como o mais potente antioxidante natural capaz de proteger os sistemas biológicos contra as injúrias causadas pelo estresse oxidativo (CHABRA et al., 2014; HE et al., 2018; REITER et al., 2016).

Diversos estudos demonstram que essa indolamina apresenta capacidade citoprotetora em diferentes níveis, atuando diretamente nos compartimentos celulares e protegendo a integridade da membrana, citoplasma, núcleo, proteínas, função e o genoma mitocondrial (REITER et al., 2000, 2009; SIRINIVASAN et al., 2011).

A melatonina parece exercer ação antioxidante por vias distintas, onde é relatada a sua atuação direta e indireta. De maneira direta, é efetiva na neutralização de EROS, bem como das espécies reativas de nitrogênio (ERNS), reduzindo a formação de hidroxilas, peroxilas, peroxinitritos e óxido nítrico (ON), respectivamente (GILAD et al., 1997; GALANO, 2011; LOREN et al., 2017; TAN et al., 1993). Com isso, acredita-se que a eficiência direta desse neurohormônio seja devido a sua composição química, que apresenta um anel

aromático e confere capacidade doadora de elétrons a esta molécula (SOUZA; MORAIS, 2016; TAN et al., 2002).

Na forma indireta, a melatonina desempenha sua função contra os radicais livres por estimular a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, catalase (CAT) e a superóxido desmutase (SOD) (DING et al., 2014; FOUAD, 2015; PANDI-PERUMAL et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2004). Além disso, a interação da MLT com as EROS ou ERNS formam 3 metabólitos distintos: 3-hidroximelatonina cíclica (3OHM), AMFK e AMK. Participando da chamada cascata de sinalização antioxidante, esses compostos também apresentam ampla capacidade de capturar radicais livres, pois é possível, que nessa cascata, sejam neutralizados até 10 tipos diferentes de radicais, característica não observada em outros antioxidantes clássicos como vitamina C, E e GSH, que são eficientes em desintoxicar apenas uma molécula oxidante (GALANO et al., 2015; GALANO; TAN; REITER, 2018; REINA; MARTINEZ, 2017; REITER et al., 2007, 2016; TAN et al., 2015).

Devido a tais características, diversos estudos tem buscado compreender a relação entre a melatonina e as complicações diabéticas. Com isso, Loo et al. (2017) demonstraram, em modelo experimental de DMT2, que a atuação da melatonina em diferentes doses (10, 20 e 50 mg/kg), durante 6 semanas, reduziu os níveis hepáticos de Malonaldeído (MDA), colesterol e triglicerídeos, além de estimular a SOD. Já Sekkin et al. (2015), verificaram em roedores com DMT1 induzido por STZ, que melatonina foi eficiente em reduzir os níveis do MDA no fígado, rim e cérebro desses animais, porém, sem observar diferenças no tecido pancreático.

Outras pesquisas relatam os efeitos da melatonina na homeostase da glicose, entretanto, dados controversos podem ser observados. Aksoy et al. (2003), Korkmaz et al. (2012) e Kose et al. (2016) relataram valores hiperglicêmicos mais baixos, em animais diabéticos após tratamento com melatonina durante 8, 6 e 2 semanas, respectivamente, enquanto que Vural et al. (2001) e Guven et al. (2006) não observam eficiência da melatonina sobre a hiperglicemia em ratos.

Com o intuito de melhorar o controle das alterações metabólicas do diabetes no tecido adiposo e sistema reprodutor masculino, Oliveira et al. (2018) observaram que a associação melatonina e insulina em ratos induzidos ao diabetes no período neonatal, leva a um melhor controle glicêmico e tem efeito benéfico sobre o eixo hipotálamo-hipófise gonadal desses animais.

No entanto, estudos sobre os efeitos de tal associação sobre a histofisiologia renal e hepática em animais diabéticos não são encontrados, fazendo-se necessário maiores investigações a fim de elucidar os possíveis mecanismos e relações existentes entre melatonina e insulina como opção terapêutica para a nefropatia diabética e suas conseqüentes alterações metabólicas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar a influência da melatonina associada à insulina sobre a fisiopatologia renal, controle metabólico, perfil inflamatório e estresse oxidativo em ratos induzidos a nefropatia diabética experimental.

#### **3.2. Específicos**

- Avaliar o perfil lipídico e glicêmico em ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina;
- Avaliar a função renal e hepática em ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina;
- Quantificar o consumo hídrico, alimentar e a diurese, assim como a albuminúria, proteinúria, glicosúria e creatinina urinária em ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina;
- Estimar a taxa de filtração glomerular através do *Clearance* de creatinina;
- Analisar a pressão arterial sistólica em ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina;
- Analisar a histomorfometria e histoquímica dos rins e fígado dos ratos diabéticos e tratados com melatonina e insulina;
- Avaliar os marcadores de inflamação para IL-6 e TNF- $\alpha$  no fígado de ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina;
- Mensurar as concentrações renais e hepáticas do MDA e GSH;

## REFERÊNCIAS

ABIOLA, D.; SATHYAPALAN; T.; HEPBURN, D. Management of type 1 and type 2 diabetes requiring insulin. **Prescriber**, v., n., p. 50-57, 2016.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D. et al. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.71, n.16, p.2997-3025, 2014.

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

AKSOY, N. et al. Effects of melatonin on oxidative–antioxidative status of tissues in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochemistry & Function**, v.21, n.2, p.121-125, 2003.

ALMEIDA, L.L. et al. Efeito protetor da melatonina sobre intoxicações por herbicidas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, v.3, p.174-180, 2016.

ALVES, R.S.C. et al. melatonina e o sono em crianças. **Pediatria**. v.1, p. 587-594, 2004.

ALVES, D. et al. LADA numa Unidade Integrada de Diabetes. **Revista Medicina Interna**, v.23, m.4, p.22-26, 2016.

AMBALDHAGE, V. et al. Chemical of darkness (Melatonin): A ray of glow to dentistry. **Journal of Indian Academy of Oral Medicine and Radiology**, v.28, n.2, p.160-166, 2016.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n.1, 142 p., 2017.

AMIM, A.H.; EL-MISSIRY, M.A.; OTHAM, A.I. Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. **European Journal of Pharmacology**, v.15, n.747, p.166-173, 2015.

ANNADURAI, T. et al. Variations in erythrocyte antioxidant levels and lipid peroxidation status and in serum lipid profile parameters in relation to blood haemoglobin A1c values in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.105, n.1, p. 58-69, 2014.

ARENDRT, J.; SKENE, D.J. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Medicine Reviews**, v.9, n.1, p.25-39, 2005.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **The Lancet**, v. 383, p. 69-82, 2014.

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

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

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

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

BENNETT, K.; ADITYA, B.S. An overview of diabetic nephropathy: Epidemiology, pathophysiology and treatment. **Journal of Diabetes Nursing**, v. 19, n.2, 2015.

BERGHE, G.V et al. Intensive insulin therapy in critically ill patients **New England Journal of Medicine**, v.345, n.19, p.1359-1367, 2001.

BERMEJO, S.; PASCUAL, J.; SOLER, M. J. The large spectrum of renal disease in diabetic patients. **Clinical Kidney Journal**, v. 10, n.2, p.255-256, 2017.

BIEKE, F. et al. From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines. **Endocrine Reviews**, v.25, n.6, p.971-1010, 2004.

BUCHANAN, T. A. et al. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**, v. 30, n. 2, p.105-111, 2007.

CALÁBRIA, L.K. et al. Myosins Are Differentially Expressed under Oxidative Stress in Chronic Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Brains. **ISRN Neuroscience**, v. 2013, 2013.

CAMPOS, M.T.G.; LEME, F.O.P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. **Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.12, n.1, p.1-8, 2017.

CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **The FASEB Journal**, v.18, n.3, p.537-539, 2004.

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

CARVALHO, A.C.V.; DOMINGUETI, C. P. Papel das citocinas inflamatórias na nefropatia diabética. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v.14, n.3, p.1177-182, 2016.

CASTRO, E. O Papel dos produtos finais de glicosilação avançada na nefropatia diabética. **Arquivos de Medicina**, v.25, n.1, 2011.

CHABRA, A. et al. Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. **Human & Experimental Toxicology**, v.33, n.2, p.185-195, 2014.

CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.20, n.4, p.546-551, 2016.

CHEN, S.; KHURY, C.; ZIYADEH, F.N. Pathophysiology and Patogenesis of Diabetic Nephropathy. In: Seldin and Giebich. **The Kidney**. Edição 5th. Academic Press p. 2605-2632, 2013.

CINAR, M. et al. Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats. **Pharmacology**, v.62, n.1, p.56-64, 2001.

CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S.C. Glândula Pineal. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 980-990.

CLAIN, J.; RAMAR, K.; SURANI, S.R. Glucose control in critical care. **World Journal of Diabetes**, v.6, n.9, p.1082-1091, 2015.

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

COBAS, R.A.; GOMES, M.B. Diabetes Mellitus. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, n.1, v.9, p. 69-75, 2010.

COLAK, E. et al. The association of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense parameters with inflammatory markers in patients with exudative form of age-related macular degeneration. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.60, n.2, p.16-30, 2017.

COOPER, M.E. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. **Diabetologia**, v.44, p.1957-1971, 2001.

CORIGLIANO, G. et al. Blood glucose changes in diabetic children and adolescents engaged in most common sports activities. **Acta Biomédica**, v. 77, p. 26-33, 2006.

CREWS, F.T. et al. Cytokines and alcohol. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.30, n.4, p. 720-730, 2006.

DAL, S; SIGRIST, S. The protective effect of antioxidants consumption on diabetes and vascular complications. **Diseases**, v.4, n.24, p.1-51, 2016.

DEEDS et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals Journal**, v. 1, n.3, p.131-140, 2011.

DEEPTHI, B.et al. A modern review of diabetes mellitus: an annihilatory metabolic disorder. **Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology**, v.3, n.1, p.1-5, 2017.

DHATARIYA, K. K.; UMPIERREZ, G.E. Guidelines for management of diabetic ketoacidosis: time to revise? **The Lancet Diabetes e Endocrinology**, v.5, n.5, p. 321-323, 2017.

DÍAZ-FLORES, M.et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. **Gaceta Médica de México**. v. 140, n. 4, p. 437- 48, 2004.

DING, G. et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells. **American Journal of Physiology Renal**, v.283, p.173–F18, 2002.

DING, K. et al. Melatonin stimulates antioxidant enzymes and reduces oxidative stress in experimental traumatic brain injury: the Nrf2–ARE signaling pathway as a potential mechanism. **Free Radical Biology and Medicine**, v.73, p.1-11, 2014.

DUBOCOVICH, M. L.; MASANA, M. I.; BENLOUCIF, S. Molecular pharmacology and function of melatonin receptor subtypes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 460, p. 181-190, 1999.

DUBOCOVICH, M. et al. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. **Frontiers in Bioscience**. v. 8, p.; 1093–1108, 2003.

DUBOCOVICH, M.L., et al. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n.3, p.343-380, 2010.

EID, A.A. et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases. **Diabetes**, v.58, n.5, p.1201–1211, 2009.

EGHBAL, M. A. et al. A review of biological and pharmacological actions of melatonin: oxidant and prooxidant properties. **Journal of Pharmacological Reports**, v.1, n.1, p. 1-9, 2016.

EMET, M. et al. A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs. **The Eurasian Journal of Medicine**, v.48, n.2, p.135-141, 2016.

FAVERO, G. et al. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammation Activation. **International Journal of Endocrinology**, v.1, p.1-14, 2017.

FERNANDES, S.M. et al. The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v.60, n.5, p. 443-449, 2016.

FERRAN, K.; PAIVA, I.A. Abordagem da cetoacidose diabética na infância e adolescência. **Revista de Pediatria SOPERJ**, v. 1, n.17, p. 45-55, 2017.

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

FERREIRA, L.T. et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n. 3, p. 182-188, 2011.

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

FOSS-FREITAS, M.C.; FOSS, M. C. Cetoacidose diabética e estado hiperglicêmico hiperosmolar. **Revista de Medicina**, v.36, n.2, p.389-393, 2003.

FOUAD, D. Antioxidant and Modulatory Effect of Melatonin on Hepatotoxicity and Oxidative Stress Induced by Orange Yellow S in Male Rats. **Pakistan Journal of Zoology**, v.47, n.2, p.383-391, 2015.

FRANCISQUETI, F.V. et al. O papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da síndrome metabólica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n.1, p. 85-91, 2017.

FURMAN, B.L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v.70, n.1, 2016.

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

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

GALANO, A. On the direct scavenging of melatonin towards the hydroxyl and or series of peroxy radicals. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n.5, p.7178-7188, 2011.

GALANO, A et al. Melatonin and its metabolites as copper chelating agents and their role in inhibiting oxidative stress: a physicochemical analysis. **Journal of Pineal Research**, v.58, n.1, p.107-116, 2015.

GALANO, A.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. **Molecules**, v.23, n.3, p.1-36, 2018.

GARZA-RODEA, A.S. et al. Anomer-Equilibrated Streptozotocin Solution for the Induction of Experimental Diabetes in Mice (*Mus musculus*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v.9, n.1, p. 40-44, 2010.

GIACCO, M; BROWNLEE, F. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation Research**, v.107, n.9, p.1058-1070, 2010.

GILAD, E. et al. Melatonin is a scavenger of peroxynitrite. **Life Sciences**, v. 60, n.10, p. 169-174, 1997.

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

GONZÁLEZ-ARTO, M. et al. Melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> Receptors in the Ram Reproductive Tract. **International Journal of Molecular Science**, v.18, n.3, p.1-29, 2017.

GUIMARÃES-SOUZA, N.K. et al. Produção aumentada de superóxido e fibrose renal: novo modelo animal. **Einstein**, v.13, n.1, p. 79-88, 2015.

GUVEN, A. et al. Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. **Acta Histochemica**, v.108, n.2, p.85-93, 2006.

HABIB, S.L. Alterations in tubular epithelial cells in diabetic nephropathy. **Journal of nephrology**, v.26, n.5, p.1-12, 2013.

HARDELAND, R. Melatonin – More than just a Pineal Hormone. **Journal of Science & Technological Research**, v.1, n.4, p.1-4, 2017.

HANEDA, M. et al. A new Classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. **Journal of Diabetes Investigation**, v.6, n.2, p.242-246, 2015.

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

HE, R. et al. Melatonin resists oxidative stress-induced apoptosis in nucleus pulposus cells. **Life Sciences**, n. 199, p.122.130, 2018.

HERMAN, M.E. et al. Insulin Therapy Increases Cardiovascular Risk: Time for a Sea of Change in Type 2 Diabetes Treatment, **Progress in Cardiovascular Disease**, v.2017, p;1-12, 2017.

HIGASHI et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction: clinical evidence and therapeutic implications. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v.24, p.165-169, 2014.

HIRIART, B. M. et al. Hormona de la oscuridad. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, v. 59, n. 4, p. 222-232, 2012.

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

HOWART, F.C. et al. Effect of Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetes Mellitus on Contraction and Calcium Transport in the Rat Heart. **JSM Diabetology and Management**, v.2, n.1, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

ISMAILOV, S.; VODOVSKAYA, A. The risk of symptomatic hypoglycemia over 4 years of intensive insulin treatment and combined therapy in type 2 diabetes patients. **Endocrine Abstracts**, v.56, p.1-12, 2018.

JACOB, T.A. et al. Diabetes mellitus gestacional: uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.6, n.2, p.33-37, 2014.

JHA, J.C.; JANDELEIT-DAHM, K.A.; COOPER, M.E. New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. **Advances in Chronic Kidney Disease**. v.21, n.3, p.318-326, 2014.

JONNALAGADDA, V.P. et al. The Prelude on Novel Receptor and Ligand Targets Involved in the Treatment of Diabetes Mellitus. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.4 n.3, p.209-217, 2014.

KING, A.J. The use of animal models in diabetes research. **British Journal of Pharmacology**, n.3, p. 877-94, 2012.

KISHORE, L.; KAJAL, A.; KAUR, N. Role of Nicotinamide in Streptozotocin Induced Diabetes in Animal Models. **Journal of Endocrinology and Thyroid Research**, n.2, v.1, p. 1-4, 2017.

KLIMENTOVA, J. et al. Effect of Melatonin on Blood Pressure and Nitric Oxide Generation in Rats With Metabolic Syndrome. **Physiological Research**, v.65, n.3, p.373-380, 2016.

KORKMAZ, G.G. et al. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. **Clinical & Investigative Medicine**, v.35, n.6, p.70-77, 2012.

KOSE, O. et al. Effects of melatonin on oxidative stress index and alveolar bone loss in diabetic rats with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.87, n.5, p.82-90, 2016.

KOZIRÓG, M. et al. Melatonin treatment improves blood pressure, lipid profile, and parameters of oxidative stress in patients with metabolic syndrome. **Journal of Pineal Research**, v.50, n.3, p.261-266, 2010.

LAGRANHA, C.J.; et al. Bases glomerulares da nefropatia diabética. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 51, n. 6, p. 901-912, 2007.

LARDONE, P.J. et al. A novel interplay between membrane and nuclear melatonin receptors in human lymphocytes: significance in IL-2 production. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 516–525, 2009.

LAWSON, T.B. et al. Hyperglycemia alters the structure and hemodynamics of the developing embryonic heart. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v.5, n.13, p. 1-12, 2018.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LIM, A. K. H. Diabetic nephropathy – complications and treatment. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease** , v.7, p. 361-381, 2014.

LOREN, P. et al. Melatonin Scavenger Properties against Oxidative and Nitrosative Stress: Impact on Gamete Handling and In Vitro Embryo Production in Humans and Other Mammals. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-17, 2017.

MA, X. et al. A metabolomic perspective of melatonin metabolism in the mouse. **Endocrinology**, v.149, p.1869–1879, 2008.

MACCHI, M.M.; BRUCE, J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.25, n.4, p. 177–195, 2004.

MAITRA, S.; BAIDYA, D.K.; KHANNA, P. Melatonin in perioperative medicine: current perspective. **Saudi Journal of Anaesthesia**, v.7, n.3, p.315-321, 2013.

MAHMOONDNIA, L. et al. An update on diabetic kidney disease, oxidative stress and antioxidant agents. **Journal of Renal Injury Prevention**, v.6, n.2, p.153-157, 2017.

MALTA, D.C. et al. Doenças crônicas não transmissíveis e a utilização de serviços de saúde: análise da Pesquisa Nacional de Saúde no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, n.1, p. 1-10, 2017.

MANGAHIN, C.C et al. Efeitos da melatonina no sistema genital feminino: breve revisão. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.54, n.3, 2008.

MARSHALL, S.M. The podocyte: a potential therapeutic target in diabetic nephropathy? **Current Pharmaceutical Design**, v.13, n.26, p. 2713–2720, 2007.

MARTINEZ-RIQUELME, A. E.; ALLISON, S. P. Insulin revisited. **Clinical of Nutrition**, 1847 v. 22, p. 7 -15, 2003.

MATOUGH, F.A. et al. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. **Sultan Qaboos University Medical Journal** , v. 12, n.1, p.5-18, 2012.

MEHMET, G. et al. Protective effects of melatonin and aminoguanidine on the cornea in streptozotocin-induced diabetic rats. **Cornea**, v. 27, n.7, p. 795-801, 2008.

MEHTA, B.K.; NERKAR, D.; BANERJEE, D. Characterization of peripheral neuropathy in rat model of Type 2 Diabetes. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.51, n.1, p.92-101, 2017.

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

MILLER, S.C. et al. The role of melatonin in immuno-enhancement: Potential application in cancer. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 87, p.81–87, 2006.

MIRANDA-DÍAZ, A.G. et al. Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy with Early Chronic Kidney Disease. **Journal of Diabetes Research**, v.16, p. 1-7, 2016.

MODARESI, A.; NAFAR, M.; SAHRAEI, Z. Oxidative Stress in Chronic Kidney Disease. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v.9, n.3, p. 165-169, 2017.

MOHAMED, J. et al. Mechanisms of Diabetes-Induced Liver Damage The role of oxidative stress and inflammation. **Sultan Qaboos University Medical Journal** , v.16, n.2. p.132-141, 2016.

MOSTAFAVINIA, A. et al. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. **Laboratory Animal Research**, v. 32, n.26, 2016.

MOZDIZAN, M. et al. The effect of melatonin on circadian blood pressure in patients with type 2 diabetes and essential hypertension. **Archives of Medical Science**, v.10, n.4, p.669-675, 2014.

MURUSSI, M. et al. Nefropatia diabética no diabetes melito tipo 2: fatores de risco e prevenção. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v.47, n.3, 2008.

NAKOU, E.S.; MAVRRIS, H.; VARDAS, P.E. Are Diabetic Patients at Increased Risk of Arrhythmias? *Hellenic Journal of Cardiology*, v.53, p.335-339, 2012.

NIMSE, S.B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v.5, p.986-006, 2015.

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

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

OLIVEIRA, A.C. et al. Combined treatment with melatonin and insulin improves glycemic control, white adipose tissue metabolism and reproductive axis of diabetic male rats. **Life Sciences**, v.199, p.159-166, 2018.

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

OLIVEIRA, E.C.; MELO, S.M.B.; PEREIRA, S.E. Diabetes mellitus gestacional: uma revisão de literatura. **Revista Científica FacMais**, v.5, n. 1, p. 128-140 2016.

ONDEI, L.S.; TERESA, F.B.; BONINI-DOMINGOS, C.R. Avaliação de fatores preditivos de estresse oxidativo em pessoas saudáveis. **Revista Biotemas**, v.2, n3, p. 167-173, 2014.

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

PALMA, H.E. et al. Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.386, n.1, p.199-210, 2014.

PANDI-PERUMAL, S.R. et al. The roles of melatonin and light in the pathophysiology and treatment of circadian rhythm sleep disorders. **Nature Clinical Practice Neurology**. v.4, p. 436-47, 2013.

POURGHASEM, M.; SHAFI, H.; BABAZADEH, Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v.6, n.3, p.120-127, 2015.

PASCHOU, S.A. et al. On type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **Endocrine Connections**, v.7, n.1, p-38-46, 2018.

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

PEKELMANN, R. M. et al. Ritmos biológicos: entendendo as horas, os dias e as estações do ano. **Einstain**, v.1, p. 143-148, 2003.

PERSSON, F.; ROSSING, P. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. **Kidney International Journals**, v.8, n.1, p.2-7, 2018.

PESCHKE, C. et al. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. **Nephron**, v.90, p. 484-488, 2002.

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

PESCHKE, E.; BACH, A.G.; MÜHLBAUER, E. Parallel signaling pathways of melatonin in the pancreatic beta-cell. **Journal of Pineal Research**, v. 40, p. 184–191, 2006.

PETERMAN, A.T. et al. Podocytes that detach in experimental membranous nephropathy are viable. **Kidney International**. v.64, n.4, p.1222-1231, 2003.

PINHEIRO, L.S. et al. Protocol of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and Glycemic Variation. **Scandinavian Journal Laboratorial Animal Science**, v.38, n.2, 2011.

RAO, V.S.N. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors and melatonin on the hyperglycemic response to streptozotocin in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n.3, p. 127–130, 2002.

REES, D.A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, n. 22, v.4, p. 359-70, 2005.

REINA, M.; MARTINEZ, A. A new free radical scavenging cascade involving melatonin and three of its metabolites (3OHM, AFMK and AMK). **Computational and Theoretical Chemistry**, v.1, n.123, p.1-12, 2015.

- REIS, J.S. et al. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.
- REITER, R. J.et al. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. **Journal of Biomedical Research**, v.7, p. 444–458, 2000.
- REITER, R. J.et al. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. **Annal of The New York Academy Sciences**, v. 939, p. 200-215, 2001.
- REITER, R.J. et al. Melatonin and its metabolites: new findings regarding their production and their radical scavenging actions. **Acta Biochimica Polonica**, v.54, n.1, 2007.
- REITER, R.J. et al. Melatonin and the pathophysiology of cellular membranes. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v.14, p.1-9, 2009.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; FUENTES-BROTO, L. Melatonin: a multitasking 1973 molecule. **Progress in Brain Research**, v, 181, p. 127-151, 2010.
- REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: Exceeding Expectations. **Physiology**, v.29, p. 325-333, 2014.
- REITER, R.J. et al. Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but Over Delivers. **Journal of Pineal Research**, v.61, p.253-278, 2016.
- REYES-TOSO, C.F. et al. Vascular reactivity in diabetic rats: effect of melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.33, n.2, p.81-62, 2002.
- ROCCO, M.V. et al. Elevated glucose stimulates TGF- $\beta$  gene expression and bioactivity in proximal tubule. **Kidney International**.v. 41, p.107-114, 1992.
- RODRIGUEZ, C. et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v.36, n.1, p. 1-9, 2004.
- SABETSKY, V.; EKBLUM, J. Insulin: A new era for an old hormone. **Pharmaceutical Research**, v.61, p.1-4, 2010.
- SALGADO, P.P.C.A. et al. Fisiopatologia da nefropatia diabética. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.14, n.3, 2004
- SALIDO, E. M. et al. Therapeutic efficacy of melatonin in 2008 reducing retinal damage in an model of early type 2 diabetes in rats. **Journal of Pineal Research**, v. 54, p. 179–189, 2013.
- SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose an lipid metabolism. **Nature**, v.414, p. 799-806, 2002.

SANTOS, B.A.; LEPRI, E.R. Fatores Morfológicos que Influenciam no Desenvolvimento do Diabetes Mellitus Tipo 1: Uma Revisão De Literatura. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.5, n.2, p.400-407, 2012.

SCHMIDT, A.M. et al. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. **Diabetes**, v.45, 1996.

SCHIMMER, C.M.D. The pros and cons of intensive insulin therapy. The **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.49, n.1, p.323-328, 2015.

SEKKIN, S. et al. DNA protective and antioxidative effects of melatonin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Turkish Journal of Biology**, v.39, p.932-940, 2015.

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

SHAH, P.; BJORNSTAD, P.; JOHNSON, J. R. Hiperuricemia como potencial fator de risco para diabetes tipo 2 e nefropatia diabética. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n.4, p. 386-387, 2016.

SHARMA, R. et al. Experimental Models on Diabetes: A Comprehensive Review. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences**, v.4, p.1-8, 2013.

SIDDIQUI, A. A. et al. Diabetes: Mechanism, Pathophysiology and Management-A Review. **International Journal of Drug Development and Research**, v.5, n.2, p.1-23, 2013.

SILVA, A.P.; FRAGOSO, A.; NEVES, P.L. Relação entre a Vitamina D com a Diabetes Mellitus e a Nefropatia Diabética. **Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension**, v.28, n.2, p.108-118, 2014.

SILVA, R.; MENG, C.; COENTRÃO, L. Diabetic Nephropathy and its two phenotypes: the proteinuric and non-proteinuric. **Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension**, v. 31, n.2, p. 122-131, 2017.

SILVEIRA, A.O.E.S.M. et al. Complicações crônicas em diabetes, estratégias e qualidade dos serviços. **Blucher Education Proceedings**, v.2, n.1, p. 1-14, 2016.

SIMKO, F.; PAULIS, L. Melatonin as a potential antihypertensive treatment. **Journal of Pineal Research**, v.42, p.319-322, 2007.

SIRINIVASAN, V. et al. Melatonin in Mitochondrial Dysfunction and Related Disorders. **International Journal of Alzheimers Disease**, v.1, p.1-47, 2011.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. 3ed. Itapevi, SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 383 p., 2017.

SOARES, J.C.M et al. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com diabetes mellitus aloxano induzido, tratados com infusão de bauhinia candicans ou syzygium jambolanum. **Ciência Rural**, v. 30, n.1, 2000.

SOUZA, J.R.M. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 90, n.2, 2008.

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

STEHLE, J. H. et al. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. **Journal of Pineal Research**, v.51, n.1, p.17–43, 2011.

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

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

SUGANYA, N. et al. Reversibility of endothelial dysfunction in diabetes: role of polyphenols. **British Journal of Nutrition**, v.116, n.2, p.223-246, 2016.

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

SZABÓ C, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice. **Diabetes**.v.55, p.3004–3012, 2006.

SZABÓ, K. et al. Histological Evaluation of Diabetic Neurodegeneration in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

TAKE, G. et al., Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, p. 621-628, 2009.

TAMURA, H. et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes 60 from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of Pineal Research**, v.3, p.280–287, 2008.

TAN D.X. et al. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology Journal**, v.1, p.57-60, 1993.

TAN, D.X. et al. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.2, n.2, p.181-197, 2002.

TAN, D.X. et al. Melatonin as a potente and inducible endogenous antioxidante synthesis and metabolism. **Molecules**, v.20, n.10, p.886-906, 2015.

TELES, Y.C.F. et al. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. **Journal of the Health Sciences Institute**, v.33, n.1, p.89-93, 2015.

TIEMESSEN, C.A. et al. Intensive insulin therapy increases the risk of hypoglycemia in neurocritical care patients. **Journal of Neurosurgical Anesthesiology**, v.23, n.3, p.206-214, 2011.

TODA, N.; IMAMURA, T.; OKAMURA, T. Alteration of nitric oxide-mediated blood flow regulation in diabetes mellitus. **Pharmacological and Therapeutics**, v.127, p.189–209, 2010.

UMANATH, K.; LEWIS, J.B. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. **American Journal of Kidney Diseases**, v.71, n.6, p.884-895, 2018.

UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM. U S Renal Data **System annual report**. Bethesda: National Institutes of Health and National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2007.

VASCONCELOS, T.B. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **Journal of Health Sciences**, v. 16, n.3, p.213-219, 2015.

VIANNA, H.R. et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v.33, n.3, p.351-364, 2011.

VIJAYALAXMI, R. Melatonin as a radioprotective agent: a review. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.59, n.3, p. 639–653, 2004.

VURAL, H. et al. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidante status of diabetic rats. **Journal of Pineal Research**, n.31, p.193–198, 2001.

WAJCHENBERG, B.L. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Ed. Roca, 1992.

WOLF, S.P.; JIANG, Z.Y; HUNT, J.V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. **Free Radical Biology & Medicine Journal**, v. 10, n.5, p. 339-352, 1991.

WOLF, G.; ZIYADEH, F.N. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. **Neprhon physiology** , v.106, n.2, p. 26-31, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global reports on diabetes**, 2016.

ZHANG, J.; LIU, J.; QIN, X. Advances in early biomarkers of diabetic nephropathy. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.64, n.1, 2018.

ZHOU, G. et al. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. **American Journal of Pathology**. v.165, p.2033–2043, 2004.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and social implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.

ZLOTOS, D. et al. MT1 and MT2 Melatonin Receptors: Ligands, Models, Oligomers, and Therapeutic Potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.58, n.8, p.3161-3185, 2013.

## CAPÍTULO II

### **Administração da melatonina combinada à insulina previne os efeitos da nefropatia diabética em ratos**

Cintia Giselle Martins Ferreira<sup>a</sup>, Marina Baptista Gomes Pessoa<sup>a</sup>, Carolline Guimarães D'assunção<sup>a</sup>, Rebeka da Costa Alves<sup>a</sup>, Yuri Mateus Lima de Albuquerque<sup>a</sup>, Valdemiro Amaro da Silva Júnior<sup>b</sup>, Leucio Duarte Vieira Filho<sup>c</sup>, Valéria Wanderley Teixeira<sup>a</sup>, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia, Avenida Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife - Pernambuco

<sup>b</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Avenida Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife - Pernambuco

<sup>c</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Avenida Professor Moraes Rego 1235, Recife - Pernambuco

\*Autor para correspondência: Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Endereço: Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos, Recife, PE, 52171-900, Brasil.

E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br

Telefone: 55-81-33206389

Conflitos de interesse: Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

Contagem de palavras: 3776

Contagem de figuras: 5

Contagem de Tabelas: 8

## **RESUMO**

*Objetivo:* Avaliou-se o efeito da administração associada entre melatonina e insulina sobre a histofisiologia, histoquímica, função renal (glicose, albumina, proteína, creatinina e ureia), além do estresse oxidativo (TBARS e GSH) em ratos com ND.

*Material e métodos:* 50 ratos albinos, com 60 dias de idade, foram divididos em 5 grupos: GC: ratos controle; GD: ratos diabéticos; GDM: ratos diabéticos tratados com melatonina; GDI: ratos diabéticos tratados com insulina; GDMI: ratos diabéticos tratados com melatonina e insulina. O diabetes foi induzido por administração intraperitoneal de estreptozotocina. A melatonina foi administrada via água de beber (10mg/kg), enquanto a insulina (5U/dia), por injeções subcutâneas, ambos durante 30 dias.

*Principais resultados:* Os resultados mostraram que os animais diabéticos apresentaram altos valores glicêmicos e hemoglobina glicada, perda de peso, lesões glomerulares e tubulares, acompanhadas do excesso de grânulos de glicogênio e fibras colágenas no tecido renal. Além disso, na análise bioquímica, observou-se aumento acentuado nas concentrações de ureia e creatinina séricas, hiperfiltração e posterior redução na função renal. Contudo, o tratamento associativo com melatonina e insulina reverteu as alterações histopatológicas, protegeu a funcionalidade renal dos animais diabéticos e normalizou os níveis da peroxidação lipídica, assim como aumentou os valores do GSH. Da mesma maneira, levou a melhora nas alterações metabólicas, excreções urinárias de glicose, proteína e albumina, assim como reduziu o acúmulo de glicogênio e colágeno renal.

*Significância:* A combinação de melatonina e insulina foi eficiente na reversão da injúria renal provocada pela nefropatia consequente do diabetes, tornando-se uma possível opção terapêutica para as alterações metabólicas e fisiológicas decorrentes dessa patologia.

**Palavras-chave:** nefropatia diabética, melatonina, insulina, metabolismo, ratos, bioquímica

## **ABSTRACT**

*Aim:* The effect of melatonin and insulin on histophysiology, histochemistry, renal function (glucose, albumin, protein, creatinine and urea), and oxidative stress (TBARS and GSH) in diabetic rats were evaluated.

*Main methods:* 50 albino rats were divided into 5 groups: GC: control rats; GD: diabetic rats; GDM: diabetic rats treated with melatonin; GDI: insulin-treated diabetic rats; GDMI: diabetic rats treated with melatonin and insulin. Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin. Melatonin was administered via drinking water (10mg/kg) and insulin (5U/day) by subcutaneous injections, both for 30 days.

*Key findings:* The results showed that diabetic animals presented high glycemic values and glycated hemoglobin, weight loss, glomerular and tubular lesions, accompanied by excess glycogen granules and collagen fibers in renal tissue. In addition, a marked increase in serum urea and creatinine concentrations, hyperfiltration, and subsequent reduction in renal function were observed in the biochemical analysis. However, associative treatment with melatonin and insulin reversed histopathological changes, protected renal function in diabetic animals and normalized levels of lipid peroxidation, as well as increased GSH values. In the same way, it led to improvement in metabolic changes, urinary excretions of glucose, protein and albumin, as well as reduced accumulation of glycogen and renal collagen.

*Significance:* The combination of melatonin and insulin was effective in protecting against kidney injury caused by diabetic nephropathy, making it a possible therapeutic option for the metabolic and physiological changes resulting from this pathology.

**Key words:** diabetic nephropathy, melatonin, insulin, metabolism, rats, biochemistry

## **Introdução**

A nefropatia diabética (ND) constitui uma das complicações microvasculares mais graves decorrentes do diabetes mellitus (DM) [1,2]. Sendo considerada a principal causa de indicação para diálise e transplante (estágio terminal da doença) e de

insuficiência renal crônica (IRC), afeta cerca de 30-50% dos portadores de hiperglicemia crônica [3].

Associada principalmente ao controle glicêmico inadequado, a ND é acompanhada de diversas alterações fisiológicas, como aumento do estresse oxidativo, disfunção glomerular, aumento nas excreções urinárias de albumina e proteínas, bem como perda progressiva da filtração glomerular [4]. A estrutura renal também sofre modificações diretas, caracterizadas principalmente pela esclerose do glomérulo, aumento de matriz extracelular e membrana basal, além de proliferação mesangial e fibrose intersticial [5,6,7].

Muitas das alterações metabólicas causadas pela hiperglicemia produzem estresse oxidativo devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS), gerados principalmente durante a auto-oxidação da glicose e em diferentes reações oxidativas que acompanham a glicação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando a danos diretos no DNA, membrana e a morte celular [8,9]. Além disso, no diabetes, ocorre redução da ação dos sistemas de defesa antioxidantes [8,10] e baixos níveis de melatonina parecem estar relacionados a esta condição [11,12].

Visando reduzir as alterações fisiológicas e os danos teciduais causados pelo estresse oxidativo, diversos estudos têm utilizado a administração exógena de substâncias antioxidantes, sendo possível associá-las a tratamentos convencionais para o diabetes [13,14,15]. A melatonina, uma delas, é uma indolamina sintetizada principalmente pela glândula pineal, destacando-se devido a sua capacidade de neutralizar radicais livres, além de regular a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e as glutatonas [16,17,18].

Dentre as abordagens terapêuticas para a o diabetes e a ND, o maior interesse é um controle glicêmico apropriado, dessa forma, para diabéticos tipo 1, a administração de insulina torna-se indispensável para tentar evitar as complicações microvasculares futuras [19,20]. Sendo assim, uma vez que o estresse oxidativo é uma condição bem estabelecida na nefropatia diabética e que a melatonina é um potente antioxidante, o presente trabalho testou a hipótese de que a administração associada de melatonina e insulina poderia ser uma opção terapêutica capaz de reduzir as alterações metabólicas, fisiopatológicas e o estresse oxidativo em ratos diabéticos.

## Material e métodos

### *Grupos experimentais*

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Farmacologia e Fisiologia Renal (LFFR) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 220 e 250g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do DMFA da UFRPE. Os animais foram mantidos em gaiolas adequadas, com alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, tendo como período luminoso de 6:00 às 18:00h. Os machos foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos, com dez animais cada: GC: ratos sem indução ao diabetes (Controle); GD: ratos induzidos ao diabetes; GDM: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina (10mg/kg/dia); GDI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina (5U/dia); GDMI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina (5U/dia) e melatonina (10mg/kg/dia). O projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado com licença n°128/2016.

### *Indução ao diabetes*

Os animais foram submetidos à indução do diabetes pela administração intraperitoneal (i.p.) de solução de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, Chemical Co, USA), após jejum alimentar (14 horas). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dose única de 50 mg/kg de peso do animal [21]. Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente [22]. A confirmação da hiperglicemia foi realizada 7 dias após a administração, com o auxílio de um glicosímetro (Glicosímetro Kit Accu-Chek Performa). Foram incluídos no estudo apenas os animais dos grupos GD, GDM, GDI e GDMI que apresentaram glicose sanguínea de jejum acima de 200 mg/dL [23].

### *Tratamento com melatonina e insulina*

A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizada através da água de beber, sempre no início da noite (18:00h). A melatonina foi

dissolvida em etanol (0,02 mL) e diluída em solução salina, na dosagem de 10mg/kg de peso corporal animal [24]. Após a preparação, as garrafas foram protegidas da luz com auxílio de papel alumínio e disponibilizadas aos animais [25] dos grupos GDM e GDMI.

A insulina (Humulin N U-100 NPH® Lilly) foi administrada por via subcutânea, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades às 10h e três unidades às 19h [26]. A insulino terapia foi realizada nos animais dos grupos GDI e GDMI. Todos os tratamentos foram realizados durante 30 dias e as análises ocorreram nos momentos Basal (antes da indução), 0 (confirmação do diabetes), 15 e 30 dias das administrações.

#### *Glicemia, Coletas sanguíneas e avaliação bioquímica*

A glicemia dos animais foi monitorada durante o período experimental, utilizando glicosímetro Accu Check e o sangue coletado por meio de contenção mecânica, através da punção da veia caudal lateral e uso de cateter intravenoso (24G), com os movimentos dos animais restritos [27]. O material foi centrifugado sob refrigeração (4°C, 3000 rpm, 10 minutos) [28] e o sobrenadante acondicionado em microtubos e armazenados em freezer a -80 °C. Utilizou-se kits da Labtest®, para as dosagens de Ureia e Creatinina. Todas as amostras foram analisadas em triplicata em analisador bioquímico (BioPlus 200).

#### *Análise dos parâmetros metabólicos*

Nos momentos Basal, 0, 15 e 30 dias experimentais, os animais foram pesados e acomodados em gaiolas metabólicas individuais, também recebendo as administrações de insulina e melatonina, para avaliação da ingesta líquida, sólida e diurese durante 24 horas. Foi oferecida uma quantidade padronizada de 50 g de ração e 250 mL de água para cada animal [30]. Posteriormente, os machos foram pesados e mensuradas a quantidade de ração, água e o volume urinário.

#### *Determinação da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca*

O acompanhamento da pressão arterial sistólica (PASis) e da frequência cardíaca (FC) foi feito através de método não invasivo, com o uso de pletismografia de cauda. Os ratos tiveram um manguito acoplado na base da cauda e a análise dos sinais foi através

de software BpMonWin (IITTC Life Science, Inc., CA, USA) [29]. Os valores foram expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e batimentos por minuto (bpm).

#### *Análise química da urina*

As amostras de urina foram centrifugadas (temperatura ambiente, 3.000 rpm, 10 minutos) e analisadas nos seguintes parâmetros: Densidade, Ph, Leucócitos, Hemoglobina, Nitritos, Corpos Cetônicos, Bilirrubina, Urobilinogênio, Proteínas e Glicose, por meio de fitas reativas comerciais (Urinálise UriAction 10 - Labtest), nos momentos referidos. A quantificação das excreções urinárias de creatinina, albumina, proteína e glicose foi realizada através de kits Labtest®. O cálculo do *clearance* de creatinina (ClCr) foi através da fórmula:  $ClCr = \text{creatinina urinária (mg/dL)} \times \text{fluxo urinário/creatinina sérica (mg/dL)}$  [31].

#### *Índice organossomático renal*

Os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia após o período experimental, sendo anestesiados com hidrocloreto de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular, associado a 100mg/kg de tiopental (i.p.). Os rins foram removidos, pesados e o índice organossomático renal (IOR) calculado pela razão entre o peso dos rins e o peso corpóreo de cada animal [32], como representado na figura abaixo:

Onde:

IO: Índice organossomático (%);

PO: Peso do órgão (g);

PC: Peso corporal (g).

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

#### *Histopatologia, histoquímica e morfometria dos rins*

Os rins foram fixados em formol 10% tamponado por 24 horas, os fragmentos processados para inclusão em parafina e os cortes (5µm) submetidos à coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.), Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Glicogênio) e Sirius red (Colágeno). Para a análise morfométrica, foram utilizadas cinco lâminas de cada grupo. A captura das imagens foi realizada com o auxílio de um Microscópio Leica DM 500 acoplado com câmera e software LAS EZ 4.3. A morfometria foi feita através do

programa imageJ e foram analisados o diâmetro e área corpuscular, área do tufo glomerular e subcapsular, sendo os resultados expressos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) [33].

#### *Estresse oxidativo tecidual*

O estresse oxidativo foi estimado pela avaliação da peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida (GSH) nos rins dos animais. O tecido foi macerado em solução de KCl 150 mM e 3 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1g de tecido: 5ml). A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método de Ohkawa et al. [34], para medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no homogenato (TBARS), tendo a curva padrão desenhada utilizando 1,1,3,3-tetraetoxi-propano (TEP) e a absorbância da fase orgânica foi mensurada à 535 nm. Enquanto isso, os níveis de GSH foram avaliados através da quantificação de grupos sulfidrilas não proteicos [35] no sobrenadante das amostras, que foram submetidas à precipitação de proteínas pela adição de ácido tricloroacético (TCA). A L-cisteína foi utilizada para construir a curva padrão do GSH e absorbância foi mensurada à 412 nm. Os níveis de malonaldeído e GSH foram corrigidos para o teor de proteína, medido pelo método de Folin-fenol [36,37].

#### *Análise estatística*

A análise estatística foi realizada pelo programa computacional GraphPad Prism 5, onde os dados foram avaliados por meio de testes paramétricos de ANOVA One-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## **Resultados**

#### *Valores glicêmicos e hemoglobina glicada*

Os animais de todos os grupos não apresentaram diferenças significativas na glicose sanguínea no momento Basal. No dia 0, todos os animais, exceto os do grupo controle, apresentaram elevação significativa na glicemia. Passados 15 e 30 dias experimentais, evidenciou-se que apenas os animais administrados com insulina de maneira isolada ou associada com a melatonina apresentaram níveis glicêmicos semelhantes aos animais do grupo controle. O tratamento com melatonina não interferiu na glicemia aos 15 dias, sendo similar ao grupo diabético e diferindo dos demais grupos. Já aos 30 dias observamos ainda neste grupo, valores glicêmicos menores em relação ao grupo diabético, porém com valores elevados aos demais grupos

experimentais (Tabela 1). O mesmo comportamento descrito foi evidenciado para as concentrações de hemoglobina glicada (Figura 1).

#### *Análise do peso corporal e parâmetros metabólicos*

Não foram observadas diferenças significativas em relação ao peso corporal no momento basal. No período 0 verificou-se redução do peso corporal em todos os animais diabéticos. Aos 15 dias apenas os animais dos grupos insulina e melatonina associada a insulina apresentaram pesos similares aos animais do grupo controle. Não houve diferença significativa entre o peso dos animais dos grupos diabético e tratado com melatonina, que apresentaram os menores valores. Aos 30 dias o animais dos grupos insulina e melatonina associada a insulina mantiveram os pesos semelhantes ao controle. Entretanto, nos animais do grupo melatonina houve um aumento significativo do peso em relação aos animais diabéticos, porém com valores abaixo dos demais grupos (Fig. 2A).

Com relação aos parâmetros metabólicos (ingestão alimentar, hídrica e excreção urinária), no período basal não houve diferença estatística entre os animais dos grupos experimentais. No período 0 houve um aumento significativo desses parâmetros nos animais diabéticos em relação aos do controle. Com relação ao consumo alimentar, aos 15 e 30 dias houve maior consumo nos animais do grupo diabético sem tratamento, porém apenas os animais dos grupos melatonina associado à insulina (15 e 30 dias) e insulina (30 dias) apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo controle. O consumo hídrico e o volume urinário tiveram o mesmo comportamento, ou seja, aumento nos animais diabéticos sem tratamento e valores semelhantes aos animais do grupo controle aos 15 e 30 dias, nos animais dos grupos insulina associada ou não a melatonina. Porém, nos animais tratados apenas com melatonina o consumo hídrico e volume urinário apresentaram valores menores que os do grupo diabético, contudo maiores que os demais grupos, exceto para o volume urinário aos 15 dias (Fig. 2B, 2C e 2D).

#### *Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca*

A avaliação dos níveis pressóricos e da frequência cardíaca não revelou diferença significativa nos animais dos grupos experimentais aos momentos Basal, 0 e

15 dias, respectivamente. Por outro lado, ao final do período experimental, foi evidenciado aumento desses parâmetros nos animais diabéticos tratados com insulina (GDI) durante 30 dias, diferindo significativamente em relação aos demais grupos estudados (Tabelas 2, 3 e 4).

#### *Análise da função renal, excreções urinárias e urinálise*

As excreções urinárias de proteína, albumina, glicose, creatinina e uréia e o ClCr não apresentaram diferenças significativas no momento basal, porém no 0 dia houve aumento significativo nas concentrações em relação aos animais do grupo controle (Tabela 2). Aos 15 dias os animais dos grupos insulina e melatonina associada a insulina apresentaram valores menores de glicose em relação aos animais dos grupos diabético sem tratamento e tratados com melatonina, que não diferiram entre si. Já as concentrações de proteína e albumina apresentaram comportamentos similares, ou seja, os animais dos grupos insulina associada ou não a melatonina tiveram valores semelhantes às observadas nos animais do grupo controle. As análises do ClCr e das concentrações de creatinina e ureia mostraram aumento significativo nos animais diabéticos sem tratamento e nos animais tratados com melatonina em relação aos animais dos demais grupos experimentais. Entretanto, apenas os animais dos grupos insulina associada ou não à melatonina apresentaram valores semelhantes ao grupo controle (Tabela 3). Aos 30 dias todos os animais dos grupos diabéticos e tratados apresentaram valores menores de glicose, proteína e albumina em relação aos animais diabéticos sem tratamento, porém apenas os animais dos grupos insulina associada ou não a melatonina apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo controle. O Clcr foi menor nos animais do grupo diabético sem tratamento em relação aos demais grupos. Os animais do grupo tratado com melatonina apresentaram os maiores valores, enquanto que os animais dos grupos insulina associada ou não a melatonina mostraram valores semelhantes aos animais do grupo controle. Para as concentrações de creatinina e ureia as maiores concentrações foram evidenciadas nos animais do grupo diabético sem tratamento, já os animais dos grupos diabéticos e tratados apresentaram valores semelhantes aos animais do grupo controle (Tabela 4).

Os parâmetros avaliados na urinálise não apresentam alterações no momento basal. No dia 0, observou-se a presença de glicose, redução do pH e da densidade na urina de todos os animais diabéticos independente do tratamento (Tabela 5). Aos 15

dias, houve presença de sangue e proteína na urina dos ratos diabéticos sem tratamento, enquanto que nos animais tratados com insulina e a associação desta com a melatonina observou-se redução na glicosúria e os valores do pH idênticos aos animais do grupo controle (Tabela 6). No fim do período experimental (30 dias) foi constatada a presença de bilirrubina e corpos cetônicos, os maiores valores de sangue, proteínas e glicose, enquanto que o pH e a densidade continuaram baixos nos animais diabéticos sem tratamento. O tratamento com a melatonina reduziu a glicose. A combinação das terapias e a insulina isolada reverteram as disfunções urinárias dos animais diabéticos sem tratamento, levando a parâmetros presentes nos animais controles, com exceção da pequena presença de glicose (Tabela 7).

#### *Análise histomorfométrica dos rins e índice organossomático (IOR)*

Houve aumento acentuado no diâmetro, área corpuscular e área subcapsular nos rins dos animais diabéticos. Os tratamentos com a melatonina, insulina e a combinação destes, levaram a uma normalização dessas características, com similaridade ao grupo controle, principalmente neste último. No entanto, a área do tufo glomerular não foi significativamente alterada (Tabela 8). O IOR apresentou valor elevado nos animais do GD. Por outro lado, os animais dos grupos GDI e GDMI normalizaram essa alteração, sendo similares ao GC. O IOR do grupo GDM apresentou similaridade ao GC e GD (Tabela 8).

#### *Análise histopatológica dos rins*

Os rins dos animais do grupo controle apresentam-se bem preservados, com glomérulos, túbulos contorcidos proximais e distais bem definidos (Fig. 3A). Nos rins dos animais diabéticos sem tratamento foi evidenciado atrofia glomerular, glomerulonefrite membranoproliferativa, e segmentação glomerular. As modificações tubulares foram caracterizadas por vacúolos irregulares, degeneração hidrópica, intensa necrose multifocal (Fig. 3B e 3C), desorganização do epitélio tubular e debris celulares, (Fig. 3C). Também foram observados vasos sanguíneos congestionados e infiltrados inflamatórios (Fig. 3D). As lesões descritas foram aparentemente reduzidas após tratamento com melatonina (Fig. 3E), insulina (Fig. 3F) e principalmente após a associação destes (Figs. 3G e 3H).

### *Avaliação histoquímica dos rins*

A concentração de glicogênio na região cortical dos rins dos animais diabéticos foi a mais elevada, diferindo dos demais grupos experimentais. O tratamento com melatonina reduziu significativamente o teor de glicogênio em relação ao grupo diabético. No entanto, apenas as administrações de insulina associada ou não à melatonina foram semelhantes às concentrações do grupo controle. Na região medular não foi evidenciada alterações significativas (Fig. 4A). A avaliação do colágeno renal também apresentou aumento acentuado na região cortical dos rins dos animais diabéticos sem tratamento, porém, a melatonina de maneira isolada ou associada à insulina mostrou-se mais efetiva por reduzir significativamente, levando a padrão semelhante ao observado no grupo controle. O tratamento com insulina isolada reduziu o colágeno, diferindo estatisticamente do grupo diabético, mas sem semelhança aos demais grupos (Fig. 4B). Também não foram observadas alterações significativas na região medular.

### *Estresse oxidativo renal*

Avaliando as concentrações renais dos níveis da peroxidação lipídica através do TBARS, observou-se um aumento significativo nos animais diabéticos sem tratamento e diabético tratado com insulina em comparação aos demais grupos experimentais. Os tratamentos com melatonina associada ou não à insulina mostraram níveis semelhantes aos dos animais do grupo controle (Fig.5A). Já o GSH, apresentou comportamento contrário, com valores reduzidos no grupo diabético sem tratamento e tratado com insulina, diferenciando-se dos demais grupos experimentais, que tiveram valores elevados, porém os tratamentos com melatonina associada ou não à insulina mostraram níveis semelhantes aos dos animais do grupo controle (Fig. 5B).

## **Discussão**

No nosso experimento a associação entre melatonina e insulina, ou este último de maneira isolada, recuperou as concentrações sanguíneas de glicose e hbA1c para os valores normais. Esse resultado se dá pela reposição de insulina nos animais, já que a STZ lesiona diretamente as células beta pancreáticas, tornando sua produção muito reduzida ou insuficiente elevando a glicemia [38,39]. No entanto, o tratamento apenas

com melatonina reduziu a glicemia e as concentrações de hbA1c quando comparado ao grupo diabético. Esses achados comprovam que a melatonina influencia o metabolismo dos carboidratos, reduzindo a hiperglicemia [40,41] e a glicosilação da hemoglobina [42,43], diminuindo a glicação enzimática [44].

Alterações metabólicas como perda de peso, polifagia, polidipsia e poliúria são comumente observadas nos animais diabéticos [30, 45, 46]. Neste estudo, o tratamento com melatonina reduziu significativamente a ingestão hídrica, sólida, o volume urinário e limitou o ganho de peso. Montano et al. [47] relataram que a administração de melatonina (5mg/kg) reduz a quantidade de ração ingerida, sem alterar o peso corporal em animais saudáveis, enquanto que nos animais diabéticos, ocorre apenas redução no tempo total de ingestão líquida e aumento na massa fecal. Já Bibak et al. [48] demonstram a capacidade da melatonina em reduzir o consumo alimentar e hídrico nos animais diabéticos, após tratamento em diferentes concentrações (2,5, 5 e 20 mg/kg) durante 2 semanas. Sabe-se que essa indolamina apresenta atividade regulatória no centro de sede e saciedade, localizado no hipotálamo [49], o que poderia explicar nossos resultados. Além disso, a grelina, hormônio produzido pelo estômago e responsável por estimular o apetite em humanos e roedores [50] encontra-se aumentada em ratos diabéticos [51] e alguns estudos tem apontado o papel inibitório da melatonina na secreção desse hormônio [52], ao mesmo tempo em que também parece regular a leptina, o ganho de peso e a deposição de gordura corporal [53,54]. Paralelamente, a reposição da insulina, seja associada ou não à melatonina, normalizou as alterações metabólicas por controlar de maneira eficiente a glicemia, restaurando o anabolismo proteico e o ganho de peso corporal [55].

A nefropatia diabética é diagnosticada pelo aumento das excreções urinárias de proteína e albumina, dos níveis séricos de ureia e creatinina, com aumento seguido da redução progressiva na taxa de filtração glomerular e consequente perda da função renal [5, 56]. Todas essas alterações foram encontradas no nosso experimento, acompanhadas de glicosúria e confirmadas pelas avaliações histomorfométricas e histoquímicas. Os tratamentos associados ou não, reverteram às alterações nas excreções urinárias, com exceção dos animais GDM, onde houve atenuação nesses parâmetros. A atuação positiva da melatonina sobre as modificações na fisiologia renal tem sido relatada por diversos autores, seja no quadro diabético ou na síndrome metabólica, restaurando a função renal de animais diabéticos através da redução nos níveis de ureia, creatina e

ácido úrico circulantes, assim como é capaz de melhorar a função renal em ratos hipertensos, diminuindo significativamente a proteinúria e favorecendo o *clearance* de creatinina [57,58,59,60]. Entretanto os mecanismos pelos quais a melatonina pode regular a funcionalidade renal ainda não são totalmente esclarecidos, porém, a presença de receptores para o hormônio em estruturas como membrana basolateral e túbulo proximal, sugerem sua influência nesse órgão [61,62], ou ainda, acredita-se que a melatonina pode regular a taxa de filtração glomerular influenciando a vasopressina e retardando o dano tecidual [63,64]. Já a insulino terapia, segundo Malatiali et al. [65] e Okamoto et al. [66] reduz a proteinúria, glicosúria e hiperfiltração nos animais diabéticos, assim como observado no nosso experimento, confirmando a importância de um controle glicêmico adequado a fim de evitar alterações na estrutura renal.

O aumento nas fibras colágenas e glicogênio também são anormalidades observadas nos rins de pacientes e no modelo experimental da ND [67,68,69]. Porém, a insulino terapia reduziu parcialmente o teor de fibras colágenas renal. Malatiali et al. [65], demonstram que a insulina é capaz de beneficiar outros parâmetros da ND, no entanto, não melhora a hipertrofia glomerular e estimula o aumento da matriz extracelular, o que poderia justificar o nosso resultado. A melatonina, por sua vez, associada ou não a insulina, foi capaz de reverter os teores de colágeno, uma vez que este hormônio possui ação antifibrótica, podendo regular diversas fases da fibrose [70-74].

Com relação ao estresse oxidativo, o tratamento com insulina de maneira isolada não reduziu a peroxidação lipídica, o que pode estar associado a um possível mecanismo de resistência à insulina, alteração na expressão de seus receptores ou consequente às oscilações glicêmicas da insulino terapia, como relatado por alguns autores [21,75]. A melatonina, por sua vez, mesmo quando associada à insulina, foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica a níveis similares ao grupo controle, além de aumentar a atividade da GSH. Isso ocorre pelo fato da melatonina em condições de estresse fisiológico atuar protegendo as membranas celulares das EROS [76], melhorar a disfunção mitocondrial [58,77], estimulando enzimas antioxidantes ou por ação indireta através dos seus metabólitos AMK e AMFK [78,79].

## **Conclusão**

O presente estudo mostrou que a melatonina e a insulina, quando associadas, atuam de forma eficiente nas alterações metabólicas e teciduais decorrentes da nefropatia diabética, podendo ser considerado um possível tratamento coadjuvante para portadores e animais diabéticos. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer seus possíveis mecanismos de ação e o uso prolongado desses fármacos associados.

## **Agradecimentos**

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

## **Referências**

- [1] G.S. Dave, K. Kalia, Hyperglycemia induced oxidative stress in type-1 and type-2 diabetic patients with and without nephropathy, *Cellular and Molecular Biology*, 53 (2007) 68-78.
- [2] K. Umanath, J.B. Lewis, Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018, *American Journal of Kidney Diseases* 71 (2018) 884-895. <http://dx.doi.org/10.1053/j.ajkd.2017.10.026>
- [3] Sociedade Brasileira de Diabetes, Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, third edition, A. Araújo Silva Farmacêutica, Itapevi (2017).
- [4] S.M. Fernandes, P.M. Cordeiro, M. Watanabe, C.D. Fonseca, M.F. Vattimo, The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats, *Archives of Endocrinology and Metabolism* 60 (2016) 443-449. <http://dx.doi.org/10.1590/2359-3997000000188>
- [5] L.T. Ferreira, I.H. Saviolli, V.E. Valenti, LC. de Abreu, Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações, *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde* 36 (2011) 182-188. <https://doi.org/10.7322/abcs.v36i3.59>
- [6] C.J. Lagranha, P. Fiorino, D.E. Casarini, B.D. Schaan, M.C. Irigoyen, Bases moleculares de Endocrinologia & Metabologia 51 (2007) 901-912. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302007000600003>

- [7] M. Pourghasem, H. Shafi, Z. Babazadeh, Histological changes of kidney in diabetic nephropathy, *Caspian Journal of Internal Medicine* 6 (2015) 120-127.
- [8] M. Díaz-Flores, L.A. Baiza-Gutman, M.A. Ibáñez-Hernández, D. Pascoe-Lira, A. Guzmán-Greenfel, J. Kumate-Rodríguez, Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica, *Gaceta Médica de México* 140 (2004) 437-448.
- [9] O.O. Erejuwa, S.A. Sulaiman, M.S. Wahab, K.N. Sirajudeen, M.S. Salleh, S. Gurtu, Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats, *Annals of Endocrinology* 71 (2010) 291-296.
- [10] S.P. Nair, N.C. Shah, R.M. Shah, Alteration in enzymatic antioxidant defense in diabetes mellitus, *Biomedical Research* 23 (2012) 402-404.
- [11] F.G. Amaral, A.O., Turati, M. Barone, J.H. Scialfa, D. do Carmo Buonfiglio, R. Peres, R.A. Peliciari-Garcia, S.C. Afeche, L. Lima, C. Scavone, S. Bordin, R.J. Reiter, L. Menna-Barreto, J. Cipolla-Neto, Melatonin synthesis impairment as a new deleterious outcome of diabetes-derived hyperglycemia, *Journal of Pineal Research* 57 (2014) 67-69. <https://doi.org/10.1111/jpi.12144>
- [12] C.C. Loo, S.H. Lin, J.S. Chang, Y.W. Chien, Effects of Melatonin on Glucose Homeostasis, Antioxidant Ability, and Adipokine Secretion in ICR Mice with NA/STZ-Induced Hyperglycemia, *Nutrients* 9 (2017) 1-13. <http://dx.doi.org/10.3390/nu9111187>
- [13] S.L. Nixdorf, I.H. Gutiérrez, Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity, *Analytica Chimica Acta* 659 (2010) 208-215. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.058>
- [14] K.S. Park, J.H. Kim, M.S. Kim, J.M. Kim, S.K. Kim, J.Y. Choi, M.H. Chung, B. Han, S.Y., Kim, H.K. Lee, Effects of insulin and antioxidant on plasma 8-hydroxyguanine and tissue 8-hydroxydeoxyguanosine in streptozotocin-induced diabetic rats, *Diabetes* 50 (2001) 2837-2841. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.12.2837>
- [15] M. Soleymaninejad, S.G. Joursaraei, F. Feizi, I.J. Anarkooli, The Effects of Lycopene and Insulin on Histological Changes and the Expression Level of Bcl-2 Family Genes in the Hippocampus of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats, *Journal of Diabetes Research* 2017 (2017) 1-9. <https://doi.org/10.1155/2017/4650939>.
- [16] D. Onk, O.A. Onk, H.S. Erol, M. Ozkaraca, S. Çomakli, T.A. Ayazoglu, U. Kuyrukluylidiz, S. Unver, Effect of melatonin on antioxidant capacity, inflammation

- and apoptotic cell death in lung tissue of diabetic rats, *Acta Cirurgica Brasileira* 33 (2018) 375-385. <https://doi.org/10.1590/s0102-865020180040000009>
- [17] R.J. Reiter, J.C. Mayo, D.X. Tan, R.M. Sainz, M. Alatorre-Jimenez, L. Qin, Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers, *Journal of Pineal Research* 61 (2016) <http://dx.doi.org/253-278.10.1111/jpi.12360>
- [18] H. Tamura, M. Kawamoto, S. Sato, I. Tamura, R. Maekawa, T. Taketani, H. Aasada, E. Takaki, A. Nakai, R.J. Reiter, N. Sugino, Long term melatonin treatment delays ovarian aging, *Journal of Pineal Research* 62 (2017). <https://doi.org/10.1111/jpi.12381>
- [19] G. Luippold, J. Bedenik, A. Voigt, R. Grempler, Short- and longterm glycemic control of streptozotocin-induced diabetic rats using different insulin preparations, *Public Library of Science* 11 (2016) 1-12. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0156346>
- [20] A. Schaschkow, C. Mura, S. Dal, A. Langlois, E. Seyfritz, C. Sookhareea, W. Bietiger, C. Peronet, N. Jeandidier, M. Pinget, S. Sigrist, E. Maillard, Impact of the type of continuous insulin administration on metabolism in a diabetic rat model, *Journal of Diabetes Research*, 1 (2016) 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/8310516>.
- [21] B. Ramesh, R. Karuna, R.S. Sreenivasa, K. Haritha, M.D. Sai, B.R.B. Sasi, D. Saralakumari, Effect of Commiphora mukul gum resin on hepatic marker enzymes, lipid peroxidation and antioxidants status in pancreas and heart of streptozotocin induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2 (2012) 898-900. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60249-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60249-4)
- [22] P. Dall'Ago, V.O.K. Silva, K.L.D. De Angelis, M.C. Irigoyen, R. Fazan Jr., H.C. Salgado, Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats, *Brazilian Journal and Medical Biological Research* 7 (2002) 843-849. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000700013>
- [23] C.T. Spadella, C.S. Macedo, J.L.M. Machado, S.A. Schellini, C.R. Padovanni, Estudo comparativo entre cinco diferentes tratamentos sobre as alterações clínicas e laboratoriais do rato diabético induzido pela aloxana, *Acta Cirurgica Brasileira* 20 (2005) 46-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502005000100008>
- [24] Ozguner, Y. Bardak, S. Comlekci, Protective effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester against retinal oxidative stress in long-term use of mobile phone: A

comparative study, *Molecular and Cellular Biochemistry* 82 (2006).  
<http://dx.doi.org/10.1007/s11010-006-1267-0>

[25] A. Agil, R.J. Reiter, A. Jiménez-Aranda, R. Ibán-Arias, M. Navarro-Alarcón, J.A. Marchal, A. Adem, G. Fernández-Vázquez, Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats, *Journal of Pineal Research* 54 (2013) 381-388. <https://dx.doi.org/10.1111/jpi.12012>

[26] L.S. Pinheiro, A.D. de Melo, A.E. Andreazzi, L.C. de Caires-Júnior, M.B. Costa, R.M.G. Garcia, Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation, *Scandinavian Journal Laboratorial Animal Sciences* 38 (2011) 117-127.

[27] C.E.M. Pereira, Contensor mecânico para ratos, *Acta Cirurgica Brasileira* 16 (2001) 271-273. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502001000400015>

[28] B.B.A. Castro, F.A.B. Colugnati, P.G.A. Suassuna, H.S. Pinheiros, Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony, *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 3 (2014) 139-149. <http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20140023>

[29] R. Muthaian, R.M. Pakirisamy, S. Parasuraman, S. Raveederan. Hypertension influences the exponential progression of inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic kidney, *J. Pharmacol. Pharmacother* 7 (2016) 159-164.

[30] M.M. Lerco, C.T. Spadella, J.L.M. Machado, S.A. Schellini, C.R. Padovini, Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial, *Acta Cirurgica Brasileira* 18 (2003) 132-142. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502003000200010>

[31] T. Bazzano, T.I. Restel, L.C. Porfirio, A.S. Souza, I.S. Silva, Renal biomarkers of male and female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) undergoing renal ischemia and reperfusion, *Acta Cirurgica Brasileira* 30 (2015) 277-288. <https://doi.org/10.1590/S0102-865020150040000007>

[32] Z. Zhang, B. Zhou, H. Wang, F. Wang, Y. Song, S. Liu, S. Xi, Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats, *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11 (2014) 1020-1033. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph110101020>.

[33] C.A. Schneider, W.S., Rasband, K.W. Elieceiri, NIH Image to imageJ: 25 years of image analysis, *Nature Methods* 9 (2012) 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

- [34] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi K, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Annual Review of Biochemistry* 95 (1979) 351–358.
- [35] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Annual Review of Biochemistry* 25 (1968) 192-195.
- [36] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *The Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265-275.
- [37] L.D. Vieira-Filho, J.S. Farias, D.B. de Queiroz, E.V. Cabral, M.M. Lima-Filho, B.R.M. Sant'Helena, R.S. Aires, V.S. Ribeiro, J. Santos-Rocha, F.E. Xavier, A.D. Paixão Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with  $\alpha$ -tocopherol, *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1864 (2018) 2488-2496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.09.019>
- [38] G.H. Tesch, T. Allen, Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy, *Nephrology* 12 (2007) 261-266. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x>.
- [39] A.N. Quinna, A.A. Badwan, Impact of streptozotocin on altering normal glucose homeostasis during insulin testing in diabetic rats compared to normoglycemic rats, *Drug Design, Development and Therapy* 9 (2015) 2515-2525. <http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S79885>
- [40] T. Georgiev, A. Tolekova, R. Kalfin, P. Hadzhibozheva, Short-term administration of melatonin or ghrelin on diabetic rats: effects on angiotensin II and vasopressin-induced uterine contractility, *Physiological Research* 66 (2017) 125-133.
- [41] P.J. Lardone, S.N. Alvarez-Sanchez, J.M. Guerrero, A. Carrilo-Vico, Melatonin and glucose metabolism: clinical relevances, *Current Pharmaceutical Design* 20 (2014) 4841-4853. <http://dx.doi.org/10.2174/1381612819666131119101032>
- [42] P.L. Montilla, J.F. Vargas, I.F. Túnez, M.C. Muñoz de Agueda, M.E. Valdevira, E.S. Cabrera, Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin, *Journal of Pineal Research* 25 (1998) 94-100.
- [43] I.B. Zavodnik, E.A. Lapshina, V.T. Cheshchevik, I.K. Dremza, J. Kujawa, S.V. Zabrodskaya, R.J. Reiter, Melatonin and succinate reduce rat liver mitochondrial dysfunction in diabetes, *Journal of Physiology and Pharmacology* 62 (2011) 421-427.

- [44] T. Anwer, Melatonin ameliorates hyperinsulinemia, glucose intolerance and insulin resistance in STZ-nicotinamide induced type 2 diabetic rats, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 6 (2014) 133-136.
- [45] M. Al-Enazi, Combined Therapy of Rutin and Silymarin has More Protective Effects on Streptozotocin-Induced Oxidative Stress in Rats, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4 (2014) 21-28. <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2014.40104>
- [46] H.O. Carvalho, B.S. F. Souza, I.V.F. Santos, R.L. Resque, C.P. Fernandes, J.C.T. Carvalho, Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin, *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26 (2016) 634-639. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.04.004>
- [47] M.E. Montano, V. Molpeceres, J.L. Mauriz, E. Garzo, I.B. Cruz, P. González, J.P. Barrio, Effect of melatonin supplementation of food and water intake in streptozotocin-diabetic and non-diabetic male wistar rats, *Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral* 26 (2010) 931-938.
- [48] B. Bibak, M. Khalili, Z. Rajaei, M. Soukhtanloo, M.A. Hadjzadeh, P. Hayatdavoudi, Effects of melatonin on biochemical factors and food and water consumption in diabetic rats, *Advanced Biomedical Research* 5 (2014) 1-6. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.139191>
- [49] D. Buonfiglio R. Parthimos, R. Dantas, R. Cerqueira Silva, G. Gomes, J. Andrade-Silva, A. Ramos-Lobo, F.G. Amaral, R. Matos, J. Sinésio-Jr, L.C. Motta-Teixeira, J. Donato-Jr, R.J. Reiter, J. Cipolla-Neto, Melatonin absence leads to long-term leptin resistance and overweight in rats, *Frontiers of Endocrinology* 27 (2018). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00122>
- [50] D.A. Schmid, K. Held, M. Ising, M. Uhr, J.C. Weikel, A. Steiger, Ghrelin stimulates appetite, imagination of food, gh, acth, and cortisol, but does not affect leptin in normal controls, *Neuropsychopharmacology* 30 (2005) 1187-1192. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300670>
- [51] T. Masaoka, H. Suzuki, H. Hosoda, T. Oda, Y. Minegishi, H. Nagata, K. Kangawa, H. Ishii, Enhanced plasma Ghrelin levels in rats with streptozotocin-induced diabetes, *FEBS Letters* 54 (2003) 64-68.
- [52] A.M. Mustonen, P. Nieminen, H. Hyvärinen, Preliminary evidence that pharmacologic melatonin treatment decreases rat ghrelin levels, *Endocrine* 16 (2001) 43-46. <http://dx.doi.org/10.1385/ENDO:16:1:43>

- [53] J. Cipolla-Neto, F.G. Amaral, S.C. Afeche, D.X. Tan, R.J. Reiter, Melatonin, energy metabolism and obesity: a review, *Journal of Pineal Research* 56 (2014) 371-381. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12137>
- [54] J. Cipolla-Neto, F.G. Amaral, Melatonin as a hormone: new physiological and clinical insights, *Endocrine Reviews* 39 (2018). <http://dx.doi.org/10.1210/er.2018-00084>
- [55] R. Elvert, A. Wille, J. Wandschneider, U. Werner, H. Glombik, A.W. Herling, Energy loss via urine and faeces – a combustive analysis in diabetic rats and the impact of antidiabetic treatment on body weight, *Diabetes, Obesity and Metabolism* 15 (2012) 324-334. <http://dx.doi.org/10.1111/dom.12030>
- [56] D.A.T. Almeida, C.P. Braga, E.L.B. Novelli, A.A.H. Fernandes, Evaluation of lipid profile and oxidative stress in STZ-induced rats treated with antioxidant vitamin, *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55 (2012) 527-536. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132012000400007>
- [57] D.P. Cardinali, P.A. Bernasconi, R. Reynoso, C.F. Toso, P. Scacchi, Melatonin may curtail the metabolic syndrome: studies on initial and fully established fructose-induced metabolic syndrome in rats, *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2013) 2502-2514. <https://doi.org/10.3390/ijms14022502>
- [58] W. Wang, J. Zhang, X. Wang, H. Wang, Q. Ren, Y. Li, Effects of melatonin on diabetic nephropathy rats via Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and TGF- $\beta$ -Smad signaling pathway, *International Journal of Experimental Pathology* 11 (2018) 2488-2496.
- [59] S. Rai, Y.A. Hajam, M. Basheer, H. Ghosh, Biochemical and histopathological inflections in hepato-renal tissues of streptozotocin (stz) induced diabetic male rats: impact of exogenous melatonin administration, *Journal of Clinical Research & Bioethics* 7 (2016) 1-11. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9627.1000290>
- [60] M.C. Cheng, T.H. Wu, L.T. Huang, Y.L. Tain, Renoprotective effects of melatonin in young spontaneously hypertensive rats with L-name, *Pediatrics and Neonatology* 55 (2014) 371-381. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.09.005>
- [61] H.S. Huang, K.C. Lu, T.K. Chao, J.S. Chen, C.Y. Guo, H.Y. Hsieh, H.K. Sytwu, C.C. Wu, Role of melatonin receptor 1A and pituitary homeobox-1 coexpression in protecting tubular epithelial cells in membranous nephropathy, *Journal of Pineal Research* 65 (2018) 1-14. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12482>

- [62] Y. Song, C.W. Chang, G.M. Brown, S.F. Pang, M. Silverman, Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule, *The FASEB Journal* 11 (1997) 93-100.
- [63] S. Kalra, S. Agrawal, M. Sahay, The reno-pineal axis: A novel role for melatonin, *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* 16 (2012) 192-194. <http://dx.doi.org/10.4103/2230-8210.93735>
- [64] B.A. Richardson, E.H. Studier, J.N. Stallone, C.M. Kennedy, Effects of melatonin on water metabolism and renal function in male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), *Journal of Pineal Research* 13 (1992) 49-59.
- [65] S. Malatiali, I. Francis, M. Barac-Neto, Insulin prevents hyperfiltration and proteinuria but not glomerular hypertrophy and increases mesangial matrix expansion in diabetic rats, *Medical Principles and Practice* 26 (2017) 78-83. <http://dx.doi.org/10.1159/000450864>
- [66] M.M. Okamoto, G.F. Anhô, R. Sabino-Silva, M.F. Marques, H.S. Freitas, R.C. Mori, K.F. Melo, U.F. Machado, Insulin intensive treatment induces resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver, *Journal of Endocrinology* 211 (2011) <https://doi.org/55-64.10.1530/JOE-11-0105>
- [67] L.J. Mullins, B.R. Conway, R.I. Menzies, L. Denby, J.J. Mullins, Renal disease pathophysiology and treatment: contributions from the rat, *The Company of Biologists* 9 (2016) 1419-1433. <http://dx.doi.org/10.1242/dmm.027276>
- [68] S.O. Kolset, Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 5 (2012) 976-986. <http://dx.doi.org/10.1369/0022155412465073>
- [69] R.R. Silveiras, E.N. Pereira, E.E. Flores, V. Estado, P.A. Reis, I.J. Silva, M.P. Machado, H.C. Neto, E. Tibiriça, A. Daliry, Combined therapy with metformin and insulin attenuates systemic and hepatic alterations in a model of high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes, *International Journal of Experimental Pathology* 97 (2016) 266-277. <https://doi.org/10.1111/iep.12184>
- [70] W. Hu, Z. Ma, S. Jiang, C. Fan, C. Deng, X. Yan, S. Di, J. Lv, R.J. Reiter, Y. Yang, Melatonin: the dawning of a treatment for fibrosis?, *Journal of Pineal Research* 60 (2015) 121-131. <http://dx.doi.org/10.1111/jpi.12302>

- [71] H. Elbe, N. Vardi, M. Esrefoglu, B. Ates, S. Yologlu, C. Taskapan, Amelioration of streptozotocin-induced diabetic nephropathy by melatonin, quercetin, and resveratrol in rats, *Human & Experimental Toxicology*, 34 (2015). <http://dx.doi.org/10.1177/0960327114531995>
- [72] M. Anwar, A.M. Meki, Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: Effects of garlic oil and melatonin, *Comparative Biochemistry and Physiology* 135 (2003) 539-547. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00114-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00114-4)
- [73] R. Gupta, P. Katariya, M. Mathur, V.K. Bajaj, S. Yadav, R. Kamal, R.S. Gupta, Antidiabetic and renoprotective activity of momordica dioica in diabetic rats, *Diabetologia Croatica* 40 (2011) 81-88.
- [74] H.E. Palma, P. Wolkmer, M. Gallio, M.M. Corrêa, R. Schmatz, G.R. Thomé, L.B. Pereira, V.S. Castro, A.B. Pereira, A. Bueno, L.S. de Oliveira, D. Rosolen, T.R. Mann, B.S. de Cecco, D.L. Graça, S.T. Lopes, C.M. Mazzanti, Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin, *Molecular and Cellular Biochemistry* 386 (2013) 199-210. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-013-1858-5>
- [75] S. Tiwari, V.K.M. Halagappa, S. Riazi, X. Hu, C.A. Ecelbarger, Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats, *Journals of the American Society of Nephrology* 18 (2007) 2661-2671. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006121410>
- [76] R.J. Reiter, D.X. Tan, A. Galano, Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity, *Frontiers in Physiology* 5 (2014) 1-4. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2014.00377>
- [77] S. Sekkin, E.D. Ipek, M. Boyacioglu, C. Kum, U. Karademir, H.S. Yalinkilinc, M.O. Ak, H. Basaloglu, DNA protective effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin - induced diabetic rats, *Frontiers in Genetics* 39 (2015) 932-940. <https://doi.org/10.3389/conf.fgene.2015.01.00024>
- [78] A. Bayir, H. Kara, A. Kiyici, H. Kiyici, A. Ak, The effects of melatonin on oxidative stress markers in an animal model of radiocontrast-induced nephropathy, *Biomedical Research* 22 (2011).
- [79] R.J. Reiter, D.X. Tan, M.P. Terron, L.J. Flores, Z. Czarnocki, Melatonin and its metabolites: New findings regarding their production and their radical scavenging actions, *Acta Biochimica Polonica* 54 (2007) 1-9.

## LEGENDA DAS FIGURAS

**Figura 1:** Concentrações sanguíneas de hemoglobina glicada nos diferentes tempos e grupos experimentais. A: HbA1c antes da indução ao diabetes. B: HbA1c após confirmação do diabetes. C: HbA1c aos 15 dias das administrações. D: HbA1c aos 30 dias das administrações. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Figura 2:** Gráficos dos parâmetros metabólicos nos diferentes tempos e grupos experimentais. A: Peso corporal (g). B: Consumo alimentar (g). C: Consumo hídrico (mL). D: Volume urinário (mL). Valores Basal, 0, 15 e 30 dias, respectivamente. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Figura 3:** Fotomicrografias do parênquima renal dos animais dos grupos experimentais. A: grupo controle (GC). B-D: grupo diabético (GD). E: grupo diabético tratado com melatonina (GDM). F: grupo diabético tratado com insulina (GDI). G-H: grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). GL - glomérulo; ES - espaço subcapsular; TCP - túbulo contorcido proximal; TCD - túbulo contorcido distal; GA - atrofia glomerular; NT - necrose tubular; \* - glomerulonefrite membranoproliferativa; GS - segmentação glomerular; DC - debris celulares; seta preta - vacuolização; seta tracejada - degeneração hidrópica; cg - congestão; IN - infiltrado inflamatório. H.E.

**Figura 4:** Quantificação histoquímica nos rins dos diferentes grupos experimentais. A: Quantificação de grânulos de glicogênio. Coloração PAS. B: Quantificação de fibras colágenas. Coloração Sirius red. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova One-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Figura 5:** Quantificação do status antioxidante nos diferentes grupos experimentais. A: Peroxidação Lipídica (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. B: Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) nos rins dos animais dos grupos experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1.** Médias  $\pm$  desvio-padrão dos níveis de plasmáticos de glicose nos diferentes tempos e grupos experimentais (mg/dL).

| Tempos  | Grupos             |                    |                    |                    |                    | P      |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|
|         | GC                 | GD                 | GDM                | GDI                | GDMI               |        |
| Basal   | 93,43 $\pm$ 10,63a | 94,29 $\pm$ 9,995a | 97,23 $\pm$ 13,21a | 92,2 $\pm$ 12,35a  | 94,71 $\pm$ 10,01a | 0,9359 |
| 0 dia   | 102,9 $\pm$ 11,45b | 356,6 $\pm$ 34,98a | 356,6 $\pm$ 34,98a | 381,1 $\pm$ 50,93a | 353,7 $\pm$ 33,44a | 0,0113 |
| 15 dias | 101,9 $\pm$ 7,010b | 410,4 $\pm$ 30,58a | 312 $\pm$ 47,80a   | 121,3 $\pm$ 17,40b | 111,0 $\pm$ 19,50b | 0,0045 |
| 30 dias | 101,7 $\pm$ 8,05c  | 470,7 $\pm$ 28,70a | 285,7 $\pm$ 79,19b | 112,0 $\pm$ 16,39c | 102,3 $\pm$ 21,15c | 0,0019 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Médias  $\pm$  desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais ao 0 dia de tratamento.

|                                  | Grupos            |                    |                    |                    |                    | P      |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|
|                                  | GC                | GD                 | GDM                | GDI                | GDMI               |        |
| <b>Glicosúria (mg/24h)</b>       | 2,57 $\pm$ 1,02b  | 220,0 $\pm$ 41,6a  | 221,0 $\pm$ 26,7a  | 230,6 $\pm$ 8,24a  | 210,8 $\pm$ 5,22a  | 0,001  |
| <b>Proteinúria (mg/24h)</b>      | 1,28 $\pm$ 0,20b  | 24,08 $\pm$ 4,31a  | 24,39 $\pm$ 1,85a  | 25,08 $\pm$ 3,24a  | 25,60 $\pm$ 2,54a  | 0,012  |
| <b>Albuminúria (mg/24h)</b>      | 0,30 $\pm$ 0,05b  | 2,203 $\pm$ 0,30a  | 2,46 $\pm$ 0,39a   | 2,33 $\pm$ 0,25a   | 2,58 $\pm$ 0,35a   | 0,018  |
| <b>ClCr (mL/min)</b>             | 1,83 $\pm$ 0,19b  | 4,90 $\pm$ 0,88a   | 5,53 $\pm$ 1,38a   | 5,43 $\pm$ 1,61a   | 4,44 $\pm$ 0,75a   | 0,013  |
| <b>Creatinina sérica (mg/dL)</b> | 0,41 $\pm$ 0,01b  | 0,57 $\pm$ 0,01a   | 0,59 $\pm$ 0,04a   | 0,58 $\pm$ 0,09a   | 0,56 $\pm$ 0,04a   | 0,022  |
| <b>Uréia sérica (mg/dL)</b>      | 31,0 $\pm$ 2,00b  | 48,45 $\pm$ 2,48a  | 48,98 $\pm$ 1,55a  | 49,10 $\pm$ 3,03a  | 47,90 $\pm$ 0,85a  | 0,004  |
| <b>PASis (mmHg)</b>              | 119,8 $\pm$ 3,33a | 123,1 $\pm$ 0,64a  | 117,6 $\pm$ 14,41a | 124,5 $\pm$ 11,12a | 120,8 $\pm$ 13,58a | 0,0921 |
| <b>FC (bpm)</b>                  | 379,0 $\pm$ 9,20a | 357,5 $\pm$ 53,93a | 364,7 $\pm$ 51,62a | 364,7 $\pm$ 52,64a | 367,5 $\pm$ 52,96a | 0,9014 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Tabela 3.** Médias  $\pm$  desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais aos 15 dias de tratamento.

|                                  | Grupos             |                    |                    |                    |                    | P      |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------|
|                                  | GC                 | GD                 | GDM                | GDI                | GDMI               |        |
| <b>Glicosúria (mg/24h)</b>       | 3,76 $\pm$ 0,39c   | 363,0 $\pm$ 46,59a | 292,6 $\pm$ 14,0a  | 27,36 $\pm$ 3,14b  | 26,84 $\pm$ 1,03b  | 0,021  |
| <b>Proteinúria (mg/24h)</b>      | 1,35 $\pm$ 0,32b   | 40,61 $\pm$ 6,60a  | 34,61 $\pm$ 5,71a  | 1,95 $\pm$ 0,80b   | 2,07 $\pm$ 0,76b   | 0,001  |
| <b>Albuminúria (mg/24h)</b>      | 0,35 $\pm$ 0,10b   | 5,67 $\pm$ 1,11a   | 5,87 $\pm$ 0,55a   | 0,48 $\pm$ 0,21b   | 0,58 $\pm$ 0,24b   | 0,013  |
| <b>ClCr (mL/min)</b>             | 1,37 $\pm$ 0,22b   | 5,56 $\pm$ 0,54a   | 5,28 $\pm$ 0,41a   | 2,14 $\pm$ 0,72b   | 2,13 $\pm$ 0,67b   | 0,019  |
| <b>Creatinina sérica (mg/dL)</b> | 0,43 $\pm$ 0,01c   | 0,85 $\pm$ 0,10a   | 0,54 $\pm$ 0,03b   | 0,37 $\pm$ 0,4c    | 0,39 $\pm$ 0,02c   | 0,026  |
| <b>Uréia sérica (mg/dL)</b>      | 30,75 $\pm$ 1,7c   | 79,20 $\pm$ 2,43a  | 47,62 $\pm$ 4,03b  | 35,45 $\pm$ 2,72c  | 34,85 $\pm$ 4,5c   | 0,016  |
| <b>PASis (mmHg)</b>              | 102,8 $\pm$ 11,73a | 114,5 $\pm$ 21,21a | 115,8 $\pm$ 14,98a | 120,1 $\pm$ 13,13a | 117,6 $\pm$ 11,39a | 0,0797 |
| <b>FC (bpm)</b>                  | 402,7 $\pm$ 50,08a | 403,7 $\pm$ 97,98a | 372,4 $\pm$ 51,55a | 407,2 $\pm$ 57,63a | 371,8 $\pm$ 49,81a | 0,0860 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Tabela 4.** Médias  $\pm$  desvio-padrão dos valores das excreções urinárias, bioquímica renal e níveis pressóricos nos grupos experimentais aos 30 dias de tratamento.

|                                  | Grupos            |                    |                   |                   |                   | P      |
|----------------------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
|                                  | GC                | GD                 | GDM               | GDI               | GDMI              |        |
| <b>Glicosúria (mg/24h)</b>       | 3,07 $\pm$ 0,73c  | 490,7 $\pm$ 88,5a  | 197,9 $\pm$ 79,2b | 6,12 $\pm$ 2,4c   | 5,84 $\pm$ 2,03c  | 0,024  |
| <b>Proteinúria (mg/24h)</b>      | 1,25 $\pm$ 0,28c  | 84,07 $\pm$ 21,37a | 21,96 $\pm$ 4,21b | 1,76 $\pm$ 0,51c  | 1,84 $\pm$ 0,61c  | 0,001  |
| <b>Albuminúria (mg/24h)</b>      | 0,37 $\pm$ 0,12c  | 6,09 $\pm$ 0,44a   | 2,88 $\pm$ 0,46b  | 0,45 $\pm$ 0,25c  | 0,38 $\pm$ 0,16c  | 0,023  |
| <b>CICr (mL/min)</b>             | 1,89 $\pm$ 0,35b  | 1,09 $\pm$ 0,45c   | 4,22 $\pm$ 0,42a  | 1,85 $\pm$ 0,20b  | 1,67 $\pm$ 0,20b  | 0,036  |
| <b>Creatinina sérica (mg/dL)</b> | 0,42 $\pm$ 0,07b  | 1,17 $\pm$ 0,18a   | 0,43 $\pm$ 0,02b  | 0,42 $\pm$ 0,02b  | 0,40 $\pm$ 0,01b  | 0,003  |
| <b>Uréia sérica (mg/dL)</b>      | 29,10 $\pm$ 1,15c | 112,0 $\pm$ 2,00a  | 32,98 $\pm$ 3,55c | 27,10 $\pm$ 1,01c | 29,17 $\pm$ 0,76c | 0,004  |
| <b>PASis (mmHg)</b>              | 107,3 9,98b       | 118,1 11,16b       | 115,8 9,94b       | 134,4 9,14a       | 111,2 13,51b      | 0,0016 |
| <b>FC (bpm)</b>                  | 377,4 45,82b      | 363,2 33,04b       | 381,2 46,06b      | 431,3 40,71a      | 347,6 1,26b       | 0,0003 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Tabela 5.** Urinálise dos animais dos grupos experimentais ao 0 dia de tratamento.

|  | Grupos   |          |          |          |          | Referência* |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|
|  | GC       | GD       | GDM      | GDI      | GDMI     |             |
| <b>Sangue (Eri./<math>\mu</math>L)</b> | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Urobilinogênio (mg/dL)</b>          | Normal   | Normal   | Normal   | Normal   | Normal   | Normal      |
| <b>Bilirrubina</b>                     | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Proteínas (mg/dL)</b>               | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Nitritos</b>                        | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Cetonas</b>                         | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>                 | Negativo | 500      | 500      | 500      | 500      | Negativo    |
| <b>Ph</b>                              | 7        | 6,5      | 6,5      | 6,5      | 6,5      | 7           |
| <b>Densidade</b>                       | 1.025    | 1.010    | 1.010    | 1.010    | 1.010    | 1.025       |
| <b>Leucócitos</b>                      | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |

\*Valores de referência da urinálise de ratos criados no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 2018.

**Tabela 6.** Urinálise dos animais dos grupos experimentais ao 15 dias de tratamento.

|  | Grupos   |             |          |          |          | Referência* |
|--|----------|-------------|----------|----------|----------|-------------|
|  | GC       | GD          | GDM      | GDI      | GDMI     |             |
| <b>Sangue (Eri./<math>\mu</math>L)</b> | Negativo | Ca.10       | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Urobilinogênio (mg/dL)</b>          | Normal   | Normal      | Normal   | Normal   | Normal   | Normal      |
| <b>Bilirrubina</b>                     | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Proteínas (mg/dL)</b>               | Negativo | 30          | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Nitritos</b>                        | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Cetonas</b>                         | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>                 | Negativo | $\geq 1000$ | 500      | 20       | 20       | Negativo    |
| <b>Ph</b>                              | 7        | 5,5         | 6,5      | 7        | 7        | 7           |
| <b>Densidade</b>                       | 1.025    | 1.005       | 1.015    | 1.015    | 1.020    | 1.025       |
| <b>Leucócitos</b>                      | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |

\*Valores de referência da urinálise de ratos criados no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 2018.

**Tabela 7.** Urinálise dos animais dos grupos experimentais ao 30 dias de tratamento.

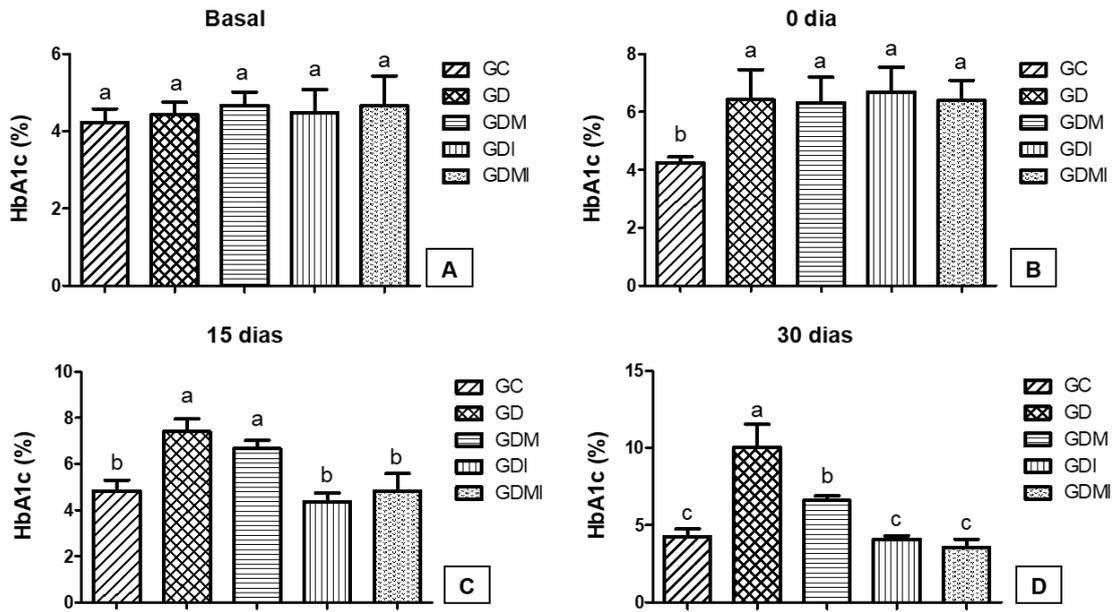
|  | Grupos   |             |          |          |          | Referência* |
|--|----------|-------------|----------|----------|----------|-------------|
|  | GC       | GD          | GDM      | GDI      | GDMI     |             |
| <b>Sangue (Eri./<math>\mu</math>L)</b> | Negativo | Ca.50       | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Urobilinogênio (mg/dL)</b>          | Normal   | Normal      | Normal   | Normal   | Normal   | Normal      |
| <b>Bilirrubina</b>                     | Negativo | ++          | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Proteínas (mg/dL)</b>               | Negativo | 100         | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Nitritos</b>                        | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Cetonas</b>                         | Negativo | ++          | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |
| <b>Glicose (mg/dL)</b>                 | Negativo | $\geq 1000$ | 150      | 20       | 20       | Negativo    |
| <b>Ph</b>                              | 7        | 5,5         | 7        | 7        | 7        | 7           |
| <b>Densidade</b>                       | 1.025    | 1.005       | 1.015    | 1.010    | 1.020    | 1.025       |
| <b>Leucócitos</b>                      | Negativo | Negativo    | Negativo | Negativo | Negativo | Negativo    |

\*Valores de referência da urinálise de ratos criados no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, 2018.

**Tabela 8.** Médias  $\pm$  desvio padrão do diâmetro corpuscular, área corpuscular, área do tufo glomerular, área subcapsular índice organossomático dos rins dos animais dos grupos experimentais.

|  | Grupos             |                    |                     |                   |                   | P      |
|--|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------|
|  | GC                 | GD                 | GDM                 | GDI               | GDMI              |        |
| <b>Diâmetro corpuscular (<math>\mu\text{m}</math>)</b>   | 110,6 $\pm$ 4,94b  | 136,7 $\pm$ 5,36a  | 117,7 $\pm$ 7,45ab  | 112,0 $\pm$ 4,92b | 111,4 $\pm$ 3,93b | 0,005  |
| <b>Área corpuscular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>     | 7802 $\pm$ 800,3b  | 11702 $\pm$ 561,4a | 9504 $\pm$ 962,6b   | 8088 $\pm$ 414,1b | 8060 $\pm$ 324,1b | 0,001  |
| <b>Área tufo glomerular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b> | 5373 $\pm$ 142,0a  | 5039 $\pm$ 1160,0a | 6253 $\pm$ 643,0a   | 5926 $\pm$ 699,3a | 6218 $\pm$ 502,3a | 0,223  |
| <b>Área subcapsular (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>     | 2762 $\pm$ 267,0bc | 5975 $\pm$ 597,9a  | 3460 $\pm$ 353,5b   | 2162 $\pm$ 285,5c | 2508 $\pm$ 341,6c | 0,0001 |
| <b>IOR (%)</b>   | 0,397 $\pm$ 0,04b  | 0,657 $\pm$ 0,08a  | 0,4906 $\pm$ 0,12ab | 0,432 $\pm$ 0,02b | 0,393 $\pm$ 0,06b | 0,012  |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ). IOR = índice organossomático renal.



**Figura 1.**

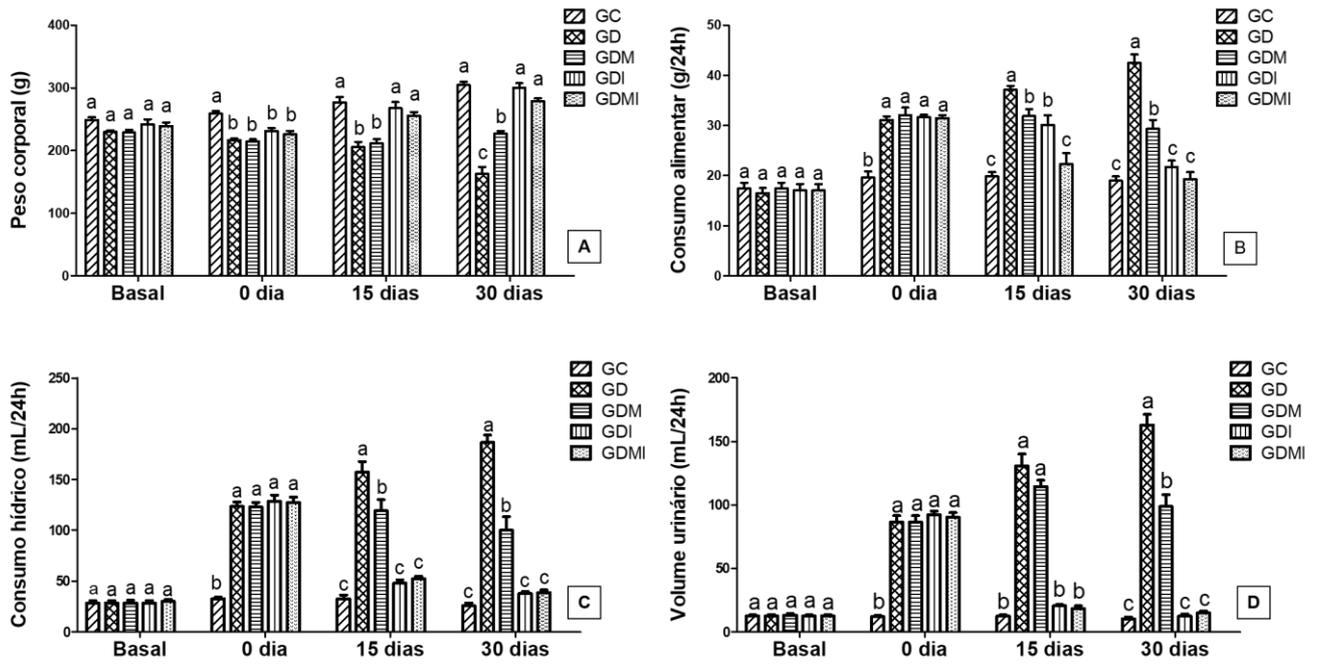


Figura 2.

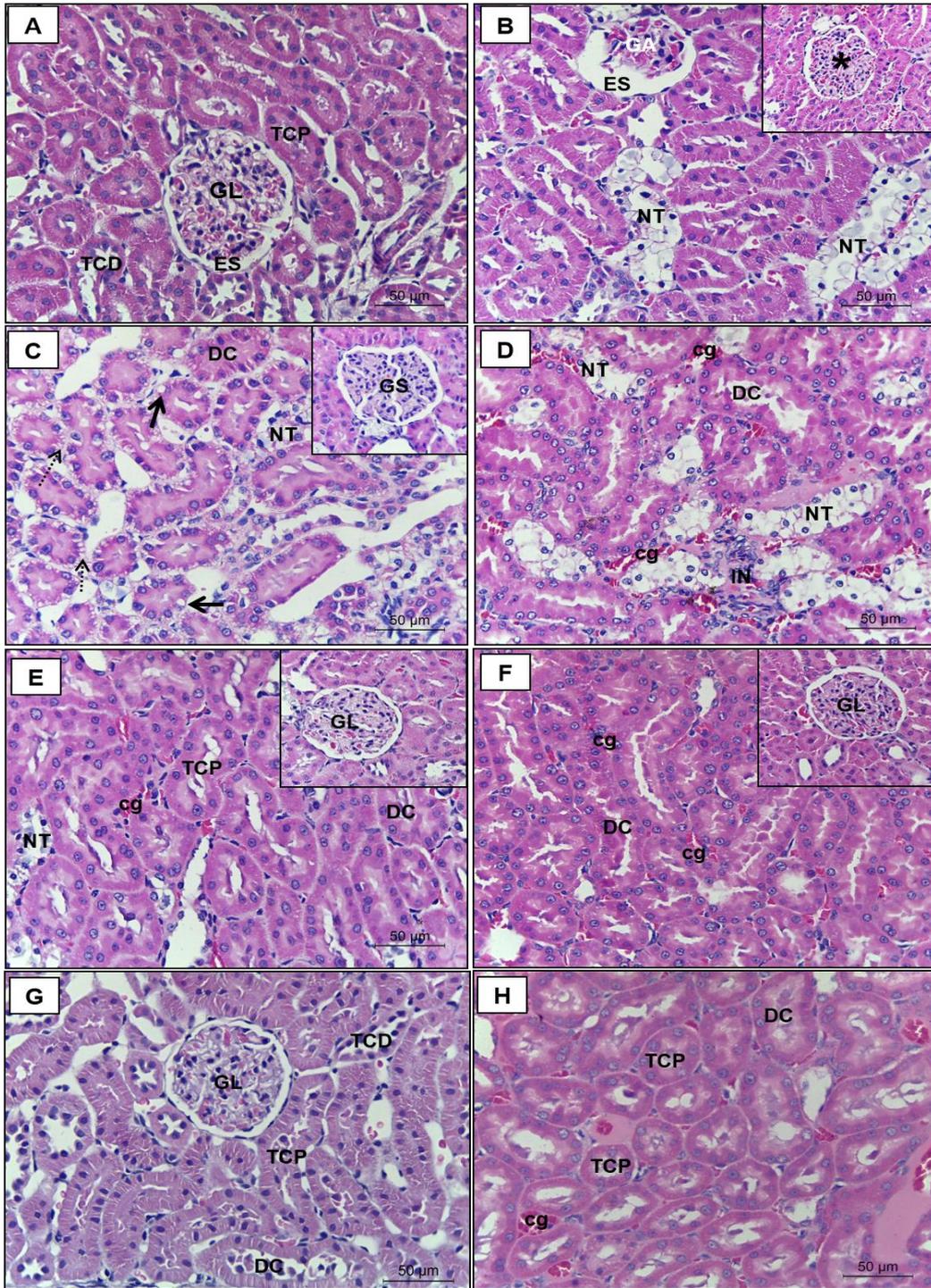
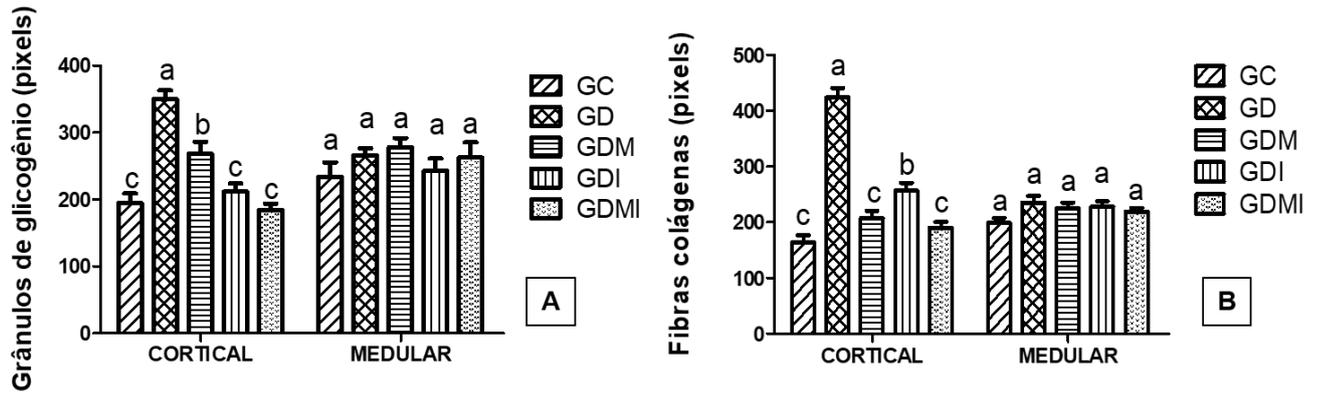
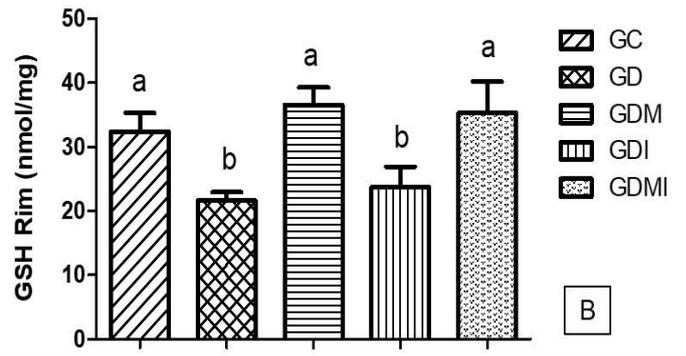
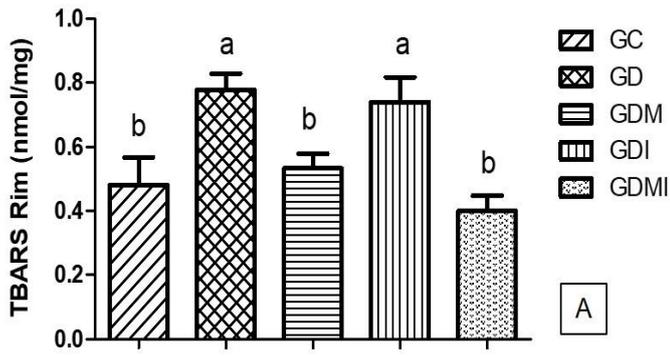


Figura 3.



**Figura 4.**



**Figura 5.**

## CAPÍTULO III

### Tratamento associativo com melatonina e insulina pode reverter alterações hepáticas decorrentes da hiperglicemia em ratos induzidos ao diabetes<sup>1</sup>

Ferreira C.G.M.<sup>2</sup>, D'assunção C.G.<sup>2</sup>, Alves E.R.<sup>2</sup>, Melo I.M.F.<sup>2</sup>, Vieira-Filho L.D.<sup>3</sup>, Wanderley-Teixeira V.<sup>2</sup> e Teixeira A.A.C.<sup>2\*</sup>

**RESUMO.-** Ferreira C.G.M., D'Assunção C.G., Alves E.R., Melo I.M.F., Vieira Filho L.D., Wanderley-Teixeira V. & Teixeira A.A.C. 2019. [Associative treatment with melatonin and insulin may reverse hepatic changes due to hyperglycemia in diabetes-induced rats.] Tratamento associativo com melatonina e insulina pode reverter alterações hepáticas decorrentes da hiperglicemia em ratos induzidos ao diabetes. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Histologia, Avenida Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, Dois Irmãos, PE 52171-900, Brazil. E-mail: [alvaro.teixeira@ufrpe.br](mailto:alvaro.teixeira@ufrpe.br)

O presente estudo, teve como objetivo avaliar o possível efeito protetor da administração associada entre melatonina e insulina no tecido hepático de ratos diabéticos, através de parâmetros bioquímicos, pressóricos, histomorfométricos, histoquímicos, inflamatórios e do status antioxidante. Foram utilizados 50 ratos albinos, com 60 dias de idade, divididos nos seguintes grupos: GC: ratos sem indução ao diabetes; GD: ratos induzidos ao diabetes; GDM: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina (10mg/kg); GDI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina (5U/dia) e GDMI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina (10mg/kg) e insulina (5U/dia), todos durante 30 dias. Os animais diabéticos apresentaram intensas lesões hepáticas, com áreas em necrose e dilatação sinusoidal, fibrose, além de alterações no perfil lipídico, aumento das transaminases, citocinas inflamatórias e estresse oxidativo. O tratamento com melatonina, melhorou a estrutura e função hepática, reduzindo a deposição de colágeno, as citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo. A insulina também recuperou algumas modificações estruturais hepáticas, com redução nas transaminases, citocinas inflamatórias e aumento do glicogênio tecidual, no entanto, os níveis da peroxidação lipídica, colesterol e triglicerídeos continuaram altos, além de elevada pressão arterial. O tratamento associativo entre melatonina e insulina mostrou-se mais eficiente em proteger e recuperar a estrutura hepática, melhorando todos os parâmetros estudados e assemelhando-se ao padrão dos animais controle, inclusive aqueles não recuperados pela administração da insulina ou melatonina de maneira isolada. Assim, a associação de melatonina e insulina atua de forma mais eficaz contra a toxicidade hepática causada pela hiperglicemia e a melatonina, possivelmente, pode ser um meio promissor para evitar os possíveis efeitos do uso prolongado da insulina e o desenvolvimento de resistência à sua ação nos tecidos-alvo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Diabetes, melatonina, fígado, inflamação, estresse oxidativo.

<sup>1</sup>Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Avenida Dom Manoel de Medeiros s/n, Recife, Dois Irmãos, PE 52171-900, Brasil. Pesquisa de doutorado com apoio FACEPE. \*Autor para correspondência: [alvaro.teixeira@ufrpe.br](mailto:alvaro.teixeira@ufrpe.br)

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego 1235, Recife, Cidade Universitária, PE 50670-901, Brasil.

**ABSTRACT.-** The aim of the present study was to evaluate the possible protective effect of melatonin and insulin administration on the hepatic tissue of diabetic rats through biochemical, blood pressure, histomorphometric, histochemical, inflammatory and antioxidant status parameters. Fifty-five day-old albino rats were divided into the following groups: GC: rats without diabetes induction; GD: rats induced to diabetes; GDM: diabetes-induced

mice treated with melatonin (10mg/kg); GDI: insulin-induced rats (5U/day) and GDMI: diabetes-induced rats and treated with melatonin (10mg/kg) and insulin (5U/day), all for 30 days. Diabetic animals presented intense hepatic lesions, with areas of necrosis and sinusoidal dilation, fibrosis, alterations in the lipid profile, increase of transaminases, inflammatory cytokines and oxidative stress. Treatment with melatonin has improved liver structure and function, reducing collagen deposition, inflammatory cytokines, and oxidative stress. Insulin also recovered some hepatic structural modifications, with reductions in transaminases, inflammatory cytokines and increased tissue glycogen; however, levels of lipid peroxidation, cholesterol and triglycerides remained high, as well as high blood pressure. The associative treatment between melatonin and insulin was shown to be more efficient in protecting and recovering the hepatic structure, improving all the studied parameters and resembling the standard of the control animals, including those not recovered by the administration of insulin or melatonin alone. Thus, the association of melatonin and insulin acts more effectively against the hepatic toxicity caused by hyperglycemia and melatonin may possibly be a promising means to avoid the possible effects of prolonged insulin use and the development of resistance to its action in the target tissues.

INDEX TERMS: Diabetes, melatonin, liver, inflammation, oxidative stress.

## INTRODUÇÃO

Considerado um grave e crescente problema de saúde pública, o diabetes mellitus (DM) é uma desordem endócrino-metabólica caracterizada por hiperglicemia e consequente alteração no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas (ADA 2017). Muito associado ao aumento do estresse oxidativo, o DM pode ocasionar, a longo prazo, disfunção e falência em diversos órgãos (Grigorov et al. 2014, Asmat et al. 2016).

Algumas pesquisas tem demonstrado que o diabetes é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento de hiperlipidemias e hepatopatias, levando a anormalidades na atividade das transaminases e alterações patológicas, como a doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) (Mohamed et al. 2016). Além disso, degeneração dos hepatócitos, aumento na deposição de fibras colágenas e elevada produção de citocinas inflamatórias como o IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  são similarmente observadas em portadores e no modelo experimental do DM (Francés et al. 2013, Mohamed et al. 2016).

A exposição contínua a níveis aumentados de glicose sanguínea resulta em alta produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem ligar-se aos lipídios das membranas celulares, levando a peroxidação lipídica (LPO) e morte celular (Volpe et al. 2018). Durante muitos anos, acreditou-se que apenas o controle glicêmico através do uso da insulina, seria o suficiente para evitar as complicações diabéticas em portadores do DM1, no entanto, há relatos de que com o passar dos anos de insulinoterapia, doses mais altas são necessárias para controlar a glicemia dos diabéticos, ocasionando uma possível resistência à insulina, que pode estar diretamente ligada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Shay et al. 2010, Teixeira et al. 2014). Junto a isso, alguns estudos tem suportado a teoria de que a própria insulina, quando utilizada constantemente, seja um indutor mais eficaz de resistência à insulina do que altas concentrações de glicose (Liu et al. 2009).

Diante disso, muitas pesquisas tem utilizado a associação da insulina com substâncias antioxidantes (Zobali et al. 2002), como a melatonina, um neurohormônio produzido pela glândula pineal e relatado que pode reduzir o estresse oxidativo, atuando como um potente antioxidante e modulando a resposta inflamatória em diversos órgãos, inclusive no fígado (Reiter et al. 2016, Zhang et al. 2017). Recentemente, Oliveira et al. (2018) demonstraram que a associação melatonina e insulina melhora a resposta do tecido adiposo e o controle glicêmico, no entanto, a associação desses hormônios diante das complicações hepáticas do diabetes não são bem relatadas.

Assim, como a melatonina é um poderoso antioxidante e capaz de modular as respostas inflamatórias em diversas patologias, nossa pesquisa objetivou avaliar se a associação dessa indolamina com a insulina pode ser uma eficiente intervenção farmacológica para prevenir as alterações hepáticas em ratos diabéticos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Grupos experimentais.** O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*) com 60 dias de idade, pesando 230 $\pm$ 20g, linhagem Wistar, procedentes do Biotério do DMFA da UFRPE. Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água “*ad libitum*”, temperatura de 22 $\pm$ 2°C e iluminação artificial que estabeleceu um fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, com período luminoso de 6:00 às 18:00h. Posteriormente, foram distribuídos aleatoriamente nos

seguintes grupos, com dez animais cada: GC: ratos sem indução ao diabetes (Controle); GD: ratos induzidos ao diabetes; GDM: ratos induzidos ao diabetes e tratados com melatonina; GDI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina; GDMI: ratos induzidos ao diabetes e tratados com insulina e melatonina. O projeto foi submetido ao comitê de ética institucional e aprovado com licença nº128/2016.

**Indução ao diabetes.** O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal (i.p.) de solução de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, Chemical Co.,USA), após jejum alimentar de 14 horas. A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio a 10mM e pH 4,5, na dose única de 50 mg/kg de peso do animal (Ramesh et al. 2012). Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam doses equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os animais foram alimentados normalmente (Dall'ago et al. 2002). A confirmação da hiperglicemia foi realizada 7 dias após a administração da droga, com o auxílio de um glicosímetro (Glicosímetro Kit Accu-Chek Performa). Foram incluídos no estudo apenas os animais que apresentaram glicose sanguínea de jejum acima de 200mg/dL (Spadella et al. 2005).

**Tratamento com melatonina e insulina.** A administração da melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizada através da água de beber, sempre no início da noite (18h). A melatonina foi dissolvida em etanol (0,02mL) e diluída em solução salina, na dosagem de 10mg/kg por peso corporal animal (Ozguner et al. 2006). Após a preparação, as garrafas foram protegidas da luz com auxílio de papel alumínio e disponibilizadas aos animais (Agil et al. 2013) dos grupos GDM e GDMI.

A insulina foi administrada por via subcutânea também durante 30 dias, na dose de 5 U/dia, sendo duas unidades de insulina às 10h e três unidades às 19h (Pinheiro et al. 2011). A insulino terapia foi realizada nos animais dos grupos GDI e GDMI. Todos os tratamentos foram realizados durante 30 dias e as análises ocorreram nos momentos Basal (antes da indução), 0 (confirmação do diabetes), 15 e 30 dias das administrações.

**Glicemia, Coletas sanguíneas e avaliação bioquímica.** A glicemia dos animais foi monitorada durante o período experimental e o sangue foi coletado por meio de contenção mecânica, através da punção da veia caudal lateral e uso de cateter intravenoso (24G) (Pereira 2001). O material foi centrifugado sob refrigeração (4°C, 3000rpm, 10 minutos) (Castro et al. 2014) e o sobrenadante acondicionado em microtubos e armazenados em freezer a -80 °C. Utilizou-se kits da Labtest®, para as dosagens de Colesterol total, Triglicerídeos, HDL, AST e ALT. Todas as amostras foram analisadas em triplicata em analisador bioquímico (BioPlus 200).

**Histopatologia, histoquímica e morfometria do fígado.** Os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia após o período experimental e anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80mg/kg) e xilazina (6mg/kg), por via intramuscular, associado a 100mg/kg de tiopental (i.p.). Os fígados foram fixados em formol 10% tamponado por 24 horas, os fragmentos processados para inclusão em parafina e os cortes submetidos à coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E.), Ácido Periódico de Schiff (PAS) (Glicogênio) e Sirius red (Colágeno), sendo posteriormente fotografados para quantificação pelo Gimp2.8. O estudo morfométrico foi realizado com auxílio de uma graticula acoplada à ocular do microscópio, com aumento de 40x, onde foram contados 10 campos por lâmina e contabilizados os pontos que incidiram sobre os hepatócitos, capilares sinusóides, espaço porta, veia centro lobular, veia hepática e células de Kupffer (Engelman et al. 2001).

**Imunohistoquímica para IL6 e TNF-  $\alpha$ .** Os cortes foram desparafinizados e reidratados em xilol e álcoois. Posteriormente procedeu-se a recuperação antigênica (tampão citrato, pH 8.0) e o bloqueio da peroxidase endógena (peróxido de hidrogênio à 3%). Os anticorpos utilizados foram IL-6 e TNF- $\alpha$ , (1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) e ambos foram diluídos em PBS/BSA 1%, overnight em câmara úmida (4°C). Os fragmentos foram incubados com o anticorpo secundário por trinta minutos (Histofine) e a reação antígeno-anticorpo foi revelada através de um precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina e contracoloração com hematoxilina de Harris. As imagens foram capturadas e submetidas ao aplicativo Gimp 2.8 para quantificação em pixels (Oberholzer et al. 1996, Lee et al. 2001).

**Estresse oxidativo tecidual.** O estresse oxidativo foi estimado pela avaliação da peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida (GSH) no fígado dos animais. O tecido hepático foi macerado em solução de KCl 150mM e 3mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1g de tecido: 5mL). A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método de Ohkawa et al. (1979), para medição de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no homogenato (TBARS), tendo a curva padrão desenhada utilizando 1,1,3,3-tetraetoxi-propano (TEP) e a absorbância da fase orgânica mensurada à 535nm. Já os níveis de GSH foram avaliados através da quantificação de grupos sulfidrilas não proteicos (Sedlak et al. 1968) no sobrenadante das amostras, que foram submetidas à precipitação de proteínas pela adição de ácido tricloroacético. A L-cisteína foi utilizada para construir a curva

padrão do GSH e absorvância foi mensurada à 412nm. Os níveis de malonaldeído e GSH foram corrigidos para o teor de proteína, medido pelo método de Folin-fenol (Lowry et al., 1951, Vieira et al. 2018).

**Análise estatística.** A análise estatística foi realizada em um programa computacional GraphicPad Prism 5, onde dados foram submetidos ao teste de normalidade e posteriormente avaliados por meio de testes paramétricos de Anova One-way com post-hoc de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Glicemia

Os animais não apresentaram diferenças significativas na glicose sanguínea no momento Basal. No dia 0, todos os animais, exceto os do grupo controle, apresentaram elevação significativa na glicemia. Passados 15 e 30 dias experimentais, evidenciou-se que apenas os animais administrados com insulina isolada ou associada à melatonina apresentaram níveis glicêmicos semelhantes ao grupo controle. O tratamento com melatonina não interferiu na glicemia aos 15 dias, sendo similar ao grupo diabético e diferindo dos demais grupos. Já aos 30 dias observamos valores hiperglicêmicos menores, indicando diferença estatística em relação a glicemia dos animais diabéticos sem tratamento, mas sem similaridade ao grupo controle (Figura 1).

### Análise bioquímica

A análise bioquímica não evidenciou diferença significativa no momento antes da indução ao diabetes (dados não mostrados). Na confirmação da hiperglicemia (0 dia) apenas os níveis de ALT estavam elevados em todos os animais induzidos ao diabetes (GD, GDM, GDI e GDMI) (Quadro 1). Aos 15 dias experimentais, foi possível observar nos animais do grupo GD, elevação nos valores de Triglicerídeos, AST e ALT quando comparado aos demais grupos. Nesse mesmo período, os grupos GDM, GDI e GDMI apresentaram redução parcial nos valores de Triglicerídeos, AST e ALT, porém sem similaridade ao GC. Já para a concentração de ALT, o grupo GDMI apresentou os menores valores quando comparado ao GDM e GDI, mas ainda apresenta diferença estatística em relação ao GC (Quadro 2). Após 30 dias de experimento, o GD apresentou elevação nos valores de colesterol total, as maiores concentrações de Triglicerídeos, AST e ALT, diferente do HDL que demonstra seus menores níveis. O tratamento com melatonina reduziu o colesterol, triglicerídeos, AST e ALT para valores semelhantes aos dos animais controle, enquanto aumentou expressivamente as concentrações de HDL, diferindo dos demais grupos. A administração de insulina melhorou a função hepática, com redução nos valores de AST e ALT semelhantes ao GC, no entanto, levou às maiores concentrações de colesterol observadas nos grupos experimentais, ao segundo maior valor de triglicerídeos, diferindo dos grupos GC, GDM e GDMI, que apresentam comportamento equivalentes. Todos os parâmetros avaliados foram semelhantes aos do grupo controle nos animais que receberam o tratamento associativo com melatonina e insulina (GDMI) (Quadro 3).

### Histopatologia hepática

A análise histopatológica das amostras de fígado dos animais do grupo controle (GC) revelou a presença de cordões de hepatócitos bem preservados, dispostos radialmente e margeados por capilares sinusóides (Fig. 2A). No entanto, o fígado dos animais diabéticos (GD) apresentaram danos teciduais caracterizados por dilatação dos capilares sinusóides (Fig. B), presença de microesteatose intracelular moderada (Fig. 2B), além da formação de trombos (Fig. 2B) e necrose massiva multifocal peri-centrolobular com células inflamatórias (Fig. 2C). Nos ratos diabéticos tratados com melatonina (GDM), o parênquima hepático apresentou-se preservado, mostrando semelhanças ao grupo controle, porém com leve congestão da veia centrolobular. Junto a isso, também foi possível observar hepatócitos com núcleos grandes e/ou bi-nucleados (Fig. 2D). Já os animais administrados com insulina (GDI), além das estruturas preservadas, foi possível evidenciar hepatócitos com leve degeneração vacuolar (Fig. 2E), enquanto que o tratamento associativo de melatonina e insulina (GDMI) promoveu estrutura hepática bem preservada e semelhante ao grupo controle, com presença de células bi-nucleadas (Fig. 2F).

### Histoquímica e morfometria hepática

A avaliação do glicogênio hepático mostrou redução significativa nos animais diabéticos (GD) quando comparados aos fígados dos animais do grupo controle (GC). O tratamento com melatonina (GDM) levou a um aumento significativo no teor de glicogênio quando comparado ao grupo diabético, porém sem semelhança ao grupo controle. A quantificação de glicogênio no fígado dos animais tratados com insulina (GDI) e naqueles tratados com a associação de melatonina e insulina (GDMI) apresentaram maior reserva, com similaridade ao observado no grupo controle (Fig. 3A).

Em relação ao colágeno, os ratos diabéticos apresentaram aumento na quantificação tecidual, diferindo estatisticamente dos demais grupos experimentais. Por outro lado, os animais que receberam a administração de melatonina (GDM), e a associação de ambos (GDMI) demonstraram os menores valores para o acúmulo de fibras

colágenas, com padrão equivalente ao encontrado nos fígados dos animais do grupo controle (GC), enquanto o grupo insulina (GDI) reduziu parcialmente esse amúculo, sem semelhança ao controle (GC) (Fig. 3B).

A análise morfométrica hepática evidenciou diminuição expressiva dos hepatócitos e aumento nos capilares sinusóides nos animais diabéticos (GD) quando comparados aos demais grupos experimentais, GC, GDM, GDI e GDMI, que apresentaram similaridade entre si. Não foram evidenciadas diferenças significativas nos parâmetros de veia centrolobular, espaço porta, veia hepática e células de Kupffer entre os grupos estudados (Quadro 4).

### **Imunohistoquímica para IL-6 e TNF- $\alpha$**

Após análise da imunohistoquímica para o IL-6 e TNF- $\alpha$  verificou-se maior marcação tecidual para estas citocinas no fígado dos ratos induzidos ao diabetes e sem tratamento, diferindo significativamente dos demais grupos. No entanto, a administração de melatonina, insulina e a associação dos fármacos promoveu padrão de imunomarcação semelhante ao grupo controle, característica observada tanto para o IL-6 (Fig. 4A-4F), quanto para o TNF- $\alpha$  (Fig. 5A-5F).

### **Estresse oxidativo hepático**

Os valores do TBARS estavam significativamente elevados no fígado dos animais do grupo diabético e diabético tratado com insulina. Porém, foi possível observar que os tratamentos com melatonina isolada ou associada à insulina promoveram valores similares ao grupo controle (Fig. 6A). Para os níveis do GSH hepático, os animais diabéticos sem tratamento e aqueles que receberam reposição de insulina apresentaram os menores valores, enquanto que a administração de melatonina ou sua associação com a insulina promoveram níveis comparáveis ao grupo controle (Fig. 6B).

## **DISCUSSÃO**

Acredita-se que o desenvolvimento da hiperglicemia pode estar associado a redução nos níveis de melatonina, e conseqüentemente, ligado à disfunções no ritmo circadiano (Qian & Scheer 2016). Em trabalho realizado por Hidayat et al. (2015), assim como no nosso, a suplementação com melatonina em ratos diabéticos acarreta diminuição parcial nas concentrações hiperglicêmicas desses animais, enquanto Amin et al. (2015) afirmam glicemia comparável dos animais diabéticos tratados com melatonina aos animais sadios. Dessa forma, a melatonina parece atuar diretamente no metabolismo da glicose, seja por estimular a síntese de insulina, melhorar a ação das células beta ou sensibilizar a ação do hormônio, como observado em ratos Zucker diabéticos e obesos (Agil et al. 2011). A reposição de insulina junto com a suplementação de melatonina regularizou o metabolismo da glicose, resultados semelhantes aos encontrados por Oliveira et al. (2018), indicando uma correlação positiva e possível sinergismo desses hormônios no controle glicêmico.

A eficiência da melatonina no controle do metabolismo lipídico também foi reportada por Agil et al. (2012), pois, quando utilizada na dosagem de 10 mg/kg, reduziu a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia em animais diabéticos. Dados semelhantes aos nossos e aos encontrados por Hussein et al. (2007), que ressaltam a diminuição do colesterol, triglicerídeos e aumento do colesterol HDL após tratamento com melatonina. Essas características hipolipidêmicas da melatonina parecem estar relacionadas a mecanismos como a redução na síntese e/ou atividade do receptor de LDL, inibição da síntese do colesterol através da redução na expressão de fatores lipogênicos como o SREBP-1c ou aumento no catabolismo do colesterol para a formação dos ácidos biliares, por exemplo, estimulando a atividade da enzima colesterol-7 $\alpha$ -carboxilase (Chan & Tang 1995, Chen et al. 2011, Chen et al. 2018). Além disso, alguns estudos afirmam que a melatonina melhora a composição lipídica do sangue e a distribuição das lipoproteínas plasmáticas, inclusive elevando as concentrações do HDL (Hussain 2007, Barquilla et al. 2014). Em contrapartida, a insulina apresenta atividade lipogênica, seja em condições normais ou patológicas. Pinheiro et al. (2011), relatam que 5U/dia de insulina restaurou as concentrações de glicose, LDL, colesterol, triglicerídeos e HDL a níveis fisiológicos. No entanto, Okamoto et al. (2011) demonstram que o tratamento intensivo com altas doses de insulina (6-9U/dia), pode levar à resistência a ação do hormônio em ratos, levando a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, que são fatores de risco para as doenças cardiovasculares. Similarmente, a administração de insulina estimula a expressão de SREBP-1 c e SREBP-2, que são responsáveis pela síntese de triglicerídeos e colesterol, em células hepáticas e adiposas de ratos (Lay et al. 2002, Owen et al. 2012, Miao et al. 2014). Esses resultados poderiam explicar o aumento nos valores do colesterol e triglicerídeos, o que pode sugerir uma tendência a resistência a ação periférica desse hormônio. Já nos animais tratados com melatonina e insulina, essas características não foram observadas, demonstrando uma possível atuação da melatonina como um agente sensibilizador insulínico e/ou confirmando sua ação hipolipidêmica.

A avaliação funcional do fígado demonstrou que as concentrações da AST e ALT apresentaram-se elevadas nos animais diabéticos, resultados semelhantes aos encontrados por Omonkhua et al. (2015) e Yakhchalian et al. (2018) após indução ao diabetes por STZ. Essas aminotransferases são de importância clínica e

diagnóstica da lesão hepática e também de outros órgãos. A AST, existente na forma mitocondrial e citoplasmática, é encontrada principalmente no fígado, coração, músculo esquelético e rim, enquanto a ALT, exclusivamente citoplasmática, está presente no fígado e rim (Thapa & Walia 2007). No presente estudo, os tratamentos com melatonina e/ou insulina nas dosagens utilizadas foram capazes de reverter o aumento nas concentrações dessas enzimas, levando à similaridade ao grupo controle.

No entanto, diferente dos nossos relatos, Zavodnik et al. (2011) não observaram reduções nos níveis de AST e ALT em animais diabéticos após tratamento com 10 mg/kg de melatonina. Já Grigorov et al. (2014) e Godam et al. (2014), corroborando os nossos resultados, reportam regressão dos danos hepáticos, seja na observação histológica ou nas concentrações das transaminases, evidenciando diminuição significativa nos valores de AST, ALT e ALP nos animais diabéticos após tratamento com melatonina. A insulina, por sua vez, também mostrou-se eficiente na manutenção dos valores basais das transaminases nos animais diabéticos, uma vez que a reposição hormonal reestabelece a homeostase hepática (Nolasco et al. 2015). Dessa forma, podemos inferir que em associação, a melatonina e insulina atuaram de maneira conjunta na recuperação fisiológica do fígado desses animais, pois, ambos podem ter desempenhado importante atividade na manutenção das membranas dos hepatócitos, impedindo que as enzimas hepáticas extravasassem e elevassem suas concentrações na corrente sanguínea.

Os achados histomorfométricos e histoquímicos confirmam que a hiperglicemia crônica pode ser tóxica ao fígado e causar diversos danos teciduais, incluindo degeneração, perda e acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos, migração de células inflamatórias, congestão de veias e dilatação sinusoidal, características semelhantes as reportadas por Welt et al. (2004) e Zafar et al. (2009), ao mesmo tempo em que pode ser observado depleção de glicogênio e aumento na síntese de colágeno hepático (Al-Ani et al. 2017, Khidr et al. 2017). Todas essas alterações foram melhoradas pelos tratamentos propostos com melatonina e/ou insulina. A melatonina provavelmente atuou protegendo as células e a arquitetura hepática dos danos oxidativos causados pelas EROS, consequentes a hiperglicemia e que podem levar a morte dos hepatócitos por apoptose e/ou necrose (Grigorov et al., 2014, Volpe et al. 2018), além de estimular a regeneração das células hepáticas (Lalena et al. 2012). Já nos animais tratados com insulina, uma vez que o fígado é um órgão insulino dependente, a reposição hormonal reverteu as lesões por regularizar o seu metabolismo, totalmente prejudicado nos animais diabéticos. Nesse contexto, a associação de ambos foi totalmente positiva na preservação e regeneração da estrutura hepática desses animais.

Os ratos diabéticos tiveram os níveis de glicogênio tecidual reduzidos, quando comparados aos demais grupos experimentais, assim como relatado em estudos anteriores (Sellamuthu et al. 2009, Alkhateeb 2015). A formação do glicogênio hepático requer a atividade de enzimas como a glicogênio sintase (GS), que converte a glicose-6-fosfato em glicogênio. No entanto, em condições de alterações metabólicas, como o diabetes, acredita-se que a menor síntese do glicogênio seja consequente a menor atividade enzimática da GS e de outras enzimas envolvidas no metabolismo hepático da glicose, como a glicoquinase (GQ) e a glicose-6-fosfatase desidrogenase (G6PD) que demonstram-se diminuídas no fígado desses animais (Huang et al. 2016, Abdelazim et al. 2018). Assim, os autores acreditam que a atividade dessas enzimas seja estimulada pela presença de insulina (Soares et al. 2012), o que pode explicar a recuperação do teor de glicogênio nos animais tratados com o hormônio de forma associada ou não à melatonina a concentrações equivalentes ao animais controle. Enquanto a melatonina de maneira isolada, apesar de não recuperar totalmente o glicogênio hepático, elevou significativamente a sua concentração quando comparado aos animais diabéticos não tratados, o que reforça a sua atuação sobre o metabolismo dos carboidratos, possivelmente estimulando a síntese de insulina pelas células beta pancreáticas ainda existentes, aumentando o influxo de glicose por atuação direta nos receptores ou influenciando de maneira positiva a atividade enzimática (Shieh et al. 2009, Bicer et al. 2011, Li et al. 2018).

Alguns estudos apontam que o diabetes pode ocasionar acúmulo de colágeno no fígado, e os nossos resultados mostram que a melatonina e insulina também influenciam a distribuição das fibras colágenas no tecido hepático, pois, a administração de ambos foi capaz de normalizar a quantidade de colágeno tecidual. Sabe-se que a insulina exerce controle sobre os fibroblastos, estimulando a síntese de colágeno (Monaco et al. 2009, Azevedo et al. 2015), enquanto a melatonina parece regular negativamente a atividade destas células (Tahan et al. 2004, Tahan et al. 2010, Saad et al. 2013). Baseando-se nesses estudos, podemos sugerir que o rígido controle glicêmico nos animais tratados com insulina, seja associado ou não à melatonina, não permitiu a produção exagerada do colágeno, já que a hiperglicemia é a responsável por desencadear as alterações celulares subsequentes que modificam o parênquima hepático e estimulam a produção de matriz extracelular e proteínas, levando à fibrose (Lucchesi et al. 2015).

A imunomarcagem pelo IL-6 e TNF- $\alpha$  no fígado dos animais diabéticos foi aumentada e estas citocinas reduziram de forma semelhante ao controle após tratamento com melatonina e/ou insulina. Os valores do TBARS também estavam elevados no grupo diabético, e, surpreendentemente, nos animais administrados com insulina, comportamento inverso ao observado para o GSH.

Nossos resultados confirmam que a hiperglicemia é responsável por aumentar a produção de EROS, a peroxidação lipídica, produção de citocinas inflamatórias assim como reduz a capacidade antioxidante, corroborando com estudos anteriores (Oršolić et al. 2013, Sekkin et al. 2015). A melatonina, por sua vez é um antioxidante que regula a resposta inflamatória e o estresse oxidativo (Tan et al. 2015). Agil et al. (2015) demonstram que o tratamento com essa indolamina reduz a disfunção mitocondrial hepática em ratos diabéticos, ao mesmo tempo em que diminui a LPO e melhora a capacidade antioxidante através da SOD e do tiol total (T-SH) (Korkmaz et al. 2012). Da mesma forma, Agil et al. (2013) reportam redução dos níveis plasmáticos de fatores como a interleucina 6, TNF-  $\alpha$  e proteína C-reativa. Assim, essas atuações da melatonina podem ser justificadas por sua ação direta através dos receptores MT1 e MT2 presentes em células como linfócitos e macrófagos, onde essa ligação pode regular negativamente a expressão e atividade de enzimas envolvidas no processo inflamatório, incluindo a fosfolipase A2, lipooxigenase e a COX- 2 (Radogna et al. 2010).

Segundo Liu et al. (2009), quando administrada continuamente, a insulina causa resistência à sua própria ação, aumento do estresse oxidativo, com redução dos níveis do GSH e acúmulo de gordura ectópica no fígado e músculo gastrocnêmico em camundongos. Isso nos faz sugerir que, por atuar na lipogênese, a insulina provavelmente estimulou a síntese de gordura no tecido hepático, levando a uma elevação no TBARS, mesmo sem elevar a expressão do TNF- $\alpha$ . Isso pode ser explicado pelo trabalho de Lee e Fried. (2012) que acreditam que o TNF- $\alpha$  atue nos adipócitos causando inflamação na tentativa de retirar o excesso de gordura acumulada. Como nesse estudo a gordura intra-hepática não foi exagerada, uma vez que os indicadores de função orgânica do fígado não estavam alterados após tratamento com insulina, os marcadores pra essa citocina foram normais, assim como o IL-6, que também tem sua expressão regulada pelo TNF- $\alpha$  (Cuervo-Suarez et al., 2003, Makki et al. 2013). Por outro lado, quando associamos melatonina e insulina, esses efeitos adversos não foram observados, sendo ressaltada a capacidade antioxidante da melatonina, inclusive aumentando a concentração do GSH.

### **CONCLUSÕES**

Diante dos resultados, podemos sugerir que a administração de melatonina associada à insulina em animais diabéticos mostrou-se muito eficiente em proteger as alterações metabólicas no tecido hepático, assim, a melatonina parece ser um adjuvante promissor no tratamento do diabetes, também evitando o possível desenvolvimento de resistência à insulina em consequência ao seu uso contínuo.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

### **Conflito de Interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

### **REFERÊNCIAS**

- Abdelazim A., Khater S., Ali H., Shalaby S., Afifi M., Saddick S., Alkaladi A. & Almaghrab O.A. 2018. Panax ginseng improves glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats through 5' Adenosine mono phosphate kinase up-regulation. Saudi J. Biol. Sci. 2018:1-6.
- ADA 2017. Standards of medical care in diabetes. Diabetes Care. 40(1):1-142.
- Agil, A., Rosado, I., Ruiz, R., Figueiroa, A., Zen, N. & Fernández-Vazquez, G. 2012. Melatonin improves glucose homeostasis in young Zucker diabetic fatty rats. J. Pineal Res. 52(2):203-210.
- Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-Mir, M.Y. & Vázquez, G.F. 2011. Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. J. Pineal Res. 50(2):207-212.
- Agil, A., Reiter, R.J., Jimenez-Aranda, A., Iban-Arias, R., Navarro-Alarcón, M., Marchal, J.A. & Fernandez-Vázquez, G. 2013. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. J Pineal Res. 54(4):381-388.

- Al-Ani, I., Abred, A., Mustafa, B.E., Wahab, E.N.A. & Azzibaidi, M.S. 2017. Effect of flaxseed extract on the liver histological structure in streptozotocin induced diabetic rats. *Med. J. Malaysia*. 16(1):91-98.
- Alkhateeb, H. H. 2015. Thujone improves glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rats through activation of Akt/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  signaling pathway. *J. Exp. Integr. Med.* 5(1):30-35.
- Amin, A.H.; El-Missiry, M.A.; Othman, A.I. 2015. Melatonin ameliorates metabolic risk factors, modulates apoptotic proteins, and protects the rat heart against diabetes-induced apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* 15(747):166-173.
- Asmat U., Abad, K., Ismail, K. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress - a concise review. *Saudi Pham. J.* 24(5):547-553.
- Azevedo F., Pessoa A., Moreira G., Dos Santos M., Liberti E., Araujo E., Cravalho C., Saad M. & Lima M.V. 2015. Effect of topical insulin on second-degree burns in diabetic rats. *Biol. Res.Nurs.* 18(2):181-192.
- Barquilla P.C., Pagano E.S., Jiménez-Ortega V., Fernández-Mateos P., Esquifini A.I. & Cardinali D.P. 2014. Melatonin normalizes clinical and biochemical parameters of mild inflammation in diet-induced metabolic syndrome in rats. *J. Pineal Res.* 57(3):280-290.
- Bicer M., Akil M., Avunduk M.C., Kilic M., Mogulkoc R. & Baltaci A.K. 2011. Interactive effects of melatonin, exercise and diabetes on liver glycogen levels. *Endokrynol. Pol.* 62(3):252-256.
- Castro B.B.A., Colugnati F.A., Cenedeze M.A., Suassuna P.G. & Pinheiro H.S. 2014. Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony. *J. Bras. Nefrol.* 36(2):139-149.
- Chan T.Y. & Tang P.L. 1995. Effect of melatonin on the maintenance of cholesterol homeostasis in the rat. *Endocr. Res.* 21(3):681-696.
- Chen X., Zhang C., Zhao M., Shi C.E., Zhu R.M., Wang H., Zhao H., Wei W., Li J.B. & Xu D.X. 2011. Melatonin alleviates lipopolysaccharide-induced hepatic SREBP-1c activation and lipid accumulation in mice. *J. Pineal Res.* 51(4):416-425.
- Chen P., Zhang R., Mou L., Li X., Qin Y. & Li X. 2018. An impaired hepatic clock system effects lipid metabolism in rats with nephropathy. *Int. J. Mol. Med.* 42(5):2720-2736.
- Cuervo-Suarez, C., Harris K.W., Kallman L., Vaannanen H.K. & Selander K.S. 2003. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Interleukin-6 Production via Extracellular-Regulated Kinase 1 Activation in Breast Cancer Cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 80(1):71-78.
- Dall'ago P., Silva V.O., De Angelis K.L., Irigoyen M.C., Frazan R. Jr. & Salgado H.C. 2002. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol Res.* 35(7):843-849.
- Engelman M. F. B., Neto, G.J., Andrade C.H.V., Hernandez R. & Goulart L.B.N.T. 2001. Estudo morfológico do fígado de ratos submetidos a doses supra-fisiológica de tiroxina. *Arqu. Bras. Endocrinol. Metabol.* 45(2):173-179.
- Francés D.E., Ingaramo P.I., Ronco M.T., & Carnovale C.E. 2013. Diabetes, an inflammatory process: Oxidative Stress and TNF-alpha involved in hepatic complication. *J. Biomed. Sci. Eng.* 2013(6):645-653.
- Godam E.T., Samaila M.O.A., Ibegbu O.A. & Hamman W.O. et al. 2014. Histological and biochemical effects of azadirachta indica and melatonin in streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Ann. Exp. Biol.* 2(2):9-22.
- Grigorov I., Bogojević D., Javanović S., Petrović A., Ivanović-Matić S., Zolotareviski L., Poznanović G. & Martinović V. 2014. Hepatoprotective effects of melatonin against pronecrotic cellular events in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Physiol Biochem.* 70(2):441-450.
- Hidayat M., Maha Y. & Wasin H. 2015. Effect of melatonin on serum glucose and body weight in streptozotocin induced diabetes in albino rats. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad.* 27(2):274-276, 2015.

- Huang M.Q., Zhou C.J., Zhang Y.P., Zhang X.Q., Xu W., Lin J. & Wang P.J. 2016. Salvianolic acid B ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 40(5):933-943.
- Hussain, S. 2007. Effect of melatonin on cholesterol absorption in rats. *J. Pineal Res.* 42(3):267-271.
- Hussein, M. R., Ahmed O.G., Hassan A.F. & Ahmed M.A. 2007. Intake of melatonin is associated with amelioration of physiological changes, both metabolic and morphological pathologies associated with obesity: an animal model. *Int. J. Exp. Pathol.* 88(1):19-29.
- Khidr B.M., El-Sokkary G.H., Saleh S.M. 2017. Study on morphological changes induced by aspartame on liver of normal and diabetic male albino rats. *Histol. Histopathol.* 4(1):1-7.
- Korkmaz G.G., Uzun H., Cakatay U. & Aydin S. 2012. Melatonin ameliorates oxidative damage in hyperglycemia-induced liver injury. *Clin. Invest. Med.* 35(6):370-377.
- Laliena A., San Miguel B., Crespo I., Alvarez M., González-Gallego J., Tuñón M.J. 2012. Melatonin attenuates inflammation and promotes regeneration in rabbits with fulminant hepatitis of viral origin. *J. Pineal Res.* 53(3):270-278.
- Lay L.S., Lefrère I., Trautwein C., Dugail I. & Krief S. 2002. Insulin and Sterol-regulatory Element-binding Protein-1c (SREBP-1C) Regulation of Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 277(38):35625-35634.
- Lee E.S., Kim J.H., Im S., Lee K.B., Sohn S. & Kang W.H. Application of computerized image analysis in pigmentary skin diseases. *Int. J. Dermatol.* 40(1):45-49.
- Lee M.J. & Fried S.K. Glucocorticoids antagonize tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated lipolysis and resistance to the antilipolytic effect of insulin in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 303(9):1126-1133.
- Li T., Ni L., Zhao Z., Liu X., Lai Z., Di X., Xie Z., Song Z., Wang X., Zhang R. & Liu C. 2018. Melatonin attenuates smoking-induced hyperglycemia via preserving insulin secretion and hepatic glycogen synthesis in rats. *J. Pineal Res.* 64(4):1-13.
- Liu H.Y., Cao S.Y., Hong T., Han J., Liu Z. & Cao W. 2009. Insulin is a stronger inducer of insulin resistance than hyperglycemia in mice with Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM). *J. Biol. Chem.* 284(40):1-27.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1):265-275.
- Lucchesi A.N., Cassettari, L.L. & Spadella, C.T. Alloxan-Induced Diabetes Causes Morphological and Ultrastructural Changes in Rat Liver that Resemble the Natural History of Chronic Fatty Liver Disease in Humans. *J. Diabetes Res.* 2015:1-13.
- Makki K., Froguel F. & Woloczuk P. 2013. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm.* 2013:1-12.
- Miao J., Haas J.T., Manthena P., Whang Y., Zhao E., Vaitheesvaran B., Kurland I.J. & Biddinger S.B. 2014. Hepatic insulin receptor deficiency impairs the SREBP-2 response to feeding and statins. *J. Lipid Res.* 55(4):659-667.
- Mohamed J., Nazratun-Nafizah A.H., Zariyantey A.H. & Budin S.B. 2016. Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ. Med.* 16(2):132-141.
- Monaco S., Illario M., Rusciano M.R., Gragnaniello G., Si Spigna G., Leggiero E., Pastore L., Fenzi G., Rossi G. & Vitale M. 2009. Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin-dependent kinase II. *Cell Cycle.* 8(13):2024-2030.
- Nolasco E.L., Zanoni F.L., Nunes F.P., Ferreira S.S., Freitas L.A., Silva M.C & Martins J.O. 2015. Insulin modulates liver function in a type I diabetes rat model. *Cell. Physiol. Biochem.* 36(4):1467-1479.
- Oberholzer M., Östreicher M., Christen H. & Brühlmann M. 1996. Methods in quantitative image analysis. *Histochem. Cell Biol.* 105(5):333-355.

- Ohkawa H., Ohishi N. & Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95(2):351–358.
- Okamoto M. M., Anhô G.F., Sabino-Silva R., Marques M.F., Feitas H.S., Mori R.C., Melo K.F. & Machado U.F. 2011. Insulin intensive treatment induces resistance in diabetic rats by impairing glucose metabolism-related mechanisms in muscle and liver. *J Endocrinol.* 211(1):55-64.
- Oliveira A.C., Andreotti S., Sertie R.A.L, Campana A.B., De Proença A.R.G., Vasconcelos R.P., Oliveira K.A., Coelho-de-Souza A.N., Donato-Junior J. & Lima F.B. 2018. Combined treatment with melatonin and insulin improves glycemic control, white adipose tissue metabolism and reproductive axis of diabetic male rats. *Life Sci.* 199:158-166.
- Omonkhua A.A., Adebayo E.A., Saliu J.A., Ogunwa T.H. & Adeyelu T.T. 2014. Liver function of streptozocin-induced diabetic rats orally administered aqueous root- bark extracts of tetrapleura tetraptera (Taub). *Nig. J. Basic Appl. Sci.* 22(3):99-106.
- Oršolić N., Sirovina D., Gajski G., Garaj-Vrhovac V., Jazvinščak-Jembrek M & Losalec I. 2013. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate. *Mutat. Res.* 757(1):36–44.
- Owen J.L., Zhang Y., Bae S.H., Farooqi M.S., Liang G., Hammer R.E., Goldstein J.L. & Brown M.S. 2012. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 109(40):16184-16189.
- Ozguner F., Bardak Y. & Comlekci S. 2006. 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.* 282(1):83–88.
- Pereira C.E.M. 2001. Contensor mecânico para ratos. *Acta Cir. Bras.* 16(4):271-273.
- Pinheiro L.S., Melo A.D., Andreazzi A.E., Caires-Júnior L.C., Costa M.B. & Garcia R.M.G. 2011. Protocol of insulin therapy for streptozotocin-diabetic rats based on a study of food ingestion and glycemic variation. *Scand. J. Lab. Anim.Sci.* 38(2):117-127.
- Qian J. & Scheer F.A.J.L. 2016. Circadian system and glucose metabolism: implications for physiology and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 27(5):282-293.
- Radogna F., Diederich M., Ghibelli, L. 2010. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 80(12):1844-1852.
- Ramesh B., Karuna R., Sreenivasa R.S., Haritha K., Sai M.D., Sasi B.R. & Saralakumari D. et al. Effect of Commiphora mukul gum resin on hepatic marker enzymes, lipid peroxidation and antioxidants status in pancreas and heart of streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2(11):895-900.
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M & Qin L. 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61:253–278.
- Reiter R.J., Mayo J.C., Tan D.X., Sainz R.M., Alatorre-Jimenez M. & Qin L. 2016. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 61(3):253-278.
- Saad R.A., El-Bab F.M. & Shalaby A.A. 2013. Attenuation of acute and chronic liver injury by melatonin in rats. *J. Taibah Univ. Sci.* 7(2):88-96.
- Schneider C. A., Rasband W.S. & Elieceiri K. W. 2012. NIH Image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9(7):671-675.
- Sedlak J. & Lindsay R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25(1):192-205.
- Sekkin S., Ipek E.D., Boyacioglu M., Kum C., Karademir U., Hande Y., Mehmet A.K. & Huli B. 2015. DNA protective effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin - induced diabetic rats. *Front. Genet.* 2015(39):932-940.

- Sellamuthu P.S., Muniappan B.P., Perumal S.M. & Kandasamy M. 2009. Antihyperglycemic effect of mangiferin in streptozotocin induced diabetic rats. *J. Res. Health Sci.* 55(2):206-214.
- Shay C.M., Secrest A.M, Goodpaster B.H., Kelsey S.F., Strotmeyer E.S. & Orchard T.J. 2010. Regional adiposity and risk for coronary artery disease in type 1 diabetes: does having greater amounts of gluteal-femoral adiposity lower the risk? *Diabetes Res. Clin. Pract.* 89(3):288–295.
- Shieh J.M., Wu H.T., Cheng K.C. & Cheng J.T. 2009. Melatonin ameliorates high fat diet-induced diabetes and stimulates glycogen synthesis via a PKC $\zeta$ -Akt-GSK3 $\beta$  pathway in hepatic cells. *J. Pineal Res.* 47(4):339-344.
- Soares A.F., Carvalho R.A., Veiga F.J., Alves M.G., Martins F.O. Viegas I., Gonz ales J.D., Met on I., Baanante I.V. & Jones J.G. 2012. Restoration of direct pathway glycogen synthesis flux in the STZ-diabetes rat model by insulin administration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303(7):875-885.
- Spadella C. T., Macedo C.S., Machado J.L.M., Schellini S.A. & Padovani C.R. .2005. Comparative study among five different treatments on the clinical and laboratory changes of the alloxan-induced diabetic rats. *Acta Cir. Bras.* 2(1):46-54.
- Tahan G. Akin H., Aydogan F., Ramadan S.S., Yapicier O., Tarcin O., Uzun H., Tahan V. & Zengin K. 2010. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile-duct ligation in rats. *Can. J. Surg.* 53(5):313-318.
- Tahan V., Ozaras R., Canbakan B., Uzun H., Aydin S., Yildirim B., Aytekin H., Ozbay G., Mert A. & Senturk H. 2004. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J. Pineal Res.* 37(2):78–84.
- Tan D.X., Manchester L.C., Esteban-Zubero C., Zhou Z & Reiter R.J. 2015. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. *Molecules.* 20(10):18886-18906.
- Teixeira M.M., Diniz-Mde F., Reis J.S., Ferrari T.C., De Castro, M.C., Teixeira B.P., Arantes I.C., Bicalho D.M. & F oscolo R.B. 2014. Insulin resistance and associated factors in patients with Type 1 Diabetes. *Diabetol. Metabol Syndr.* 6:1-10.
- Thapa B.R. & Walia A. 2007. Liver Function Tests and their Interpretation. *Indian J. Pediatr.* 74:663-671.
- Vieira L.D., Farias J.S., De Queiroz D.B., Cabral E.V., Lima-Filho V.M., Sant’Helena B.R.M., Aires R.S., Ribeiro V.S., Santos-Rocha J., Xavier F.E. & Paix o E.D. 2018. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with  $\alpha$ -tocopherol. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1864(12):3577-3587.
- Volpe C.M.O., Vilar- Delfino P.H., Dos Anjos P.M.F. & Nogueira-Machado J.A. 2018. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death Dis.* 9(2):1-9, 2018.
- Welt K., Weiss J., Martin R., Dettmer D., Hermsdorf T., Asayama K., Meister S. & Fitzil G. 2004. Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes und acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. *Exp. Toxicol. Pathol.* 55(5):331–345.
- Yakhchalian N., Mohammadian N., Hatami K., Nosrati H. 7 Yousofvand N. 2018. Hematological and serum biochemical analysis of streptozotocin-induced insulin dependent diabetes mellitus in male adult wistar rats. *bioRxiv.* 2018:1-13.
- Zafar M. & Naeem-ul-Hassan Naqvi S. Effects of STZ-Induced diabetes on the relative weights of kidney, liver and pancreas in albino rats: a comparative study. *Int. J. Morphol.* 289(1):135-141.
- Zavodnik I. B., Lapshina E.A., Cheshchevsk V.T., Dremza I.K., Kujawa J., Zabrodskaya S.V. & Reiter J. 2011. Melatonin and succinate reduce rat liver mitochondrial dysfunction in diabetes. *J. Physiol. Pharm.* 62(4):421-427.
- Zhang J.J., Meng X., Li Y., Zhou Y., Xu D.P., Li S. & Li H.B. 2017. Effects of melatonin on liver injuries and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 18(4):2-27.
- Zobali F., Avci A., Canolat O. & Karasu C. 2002. Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem. Funct.* 20(2):75-80.

## LEGENDAS DAS FIGURAS

**Fig.1.** Concentrações sanguíneas de glicose nos diferentes tempos e grupos experimentais (mg/dL). **(A)** - Glicemia antes da indução ao diabetes. **(B)**- Glicemia após confirmação do diabetes. **(C)**- Glicemia aos 15 dias das administrações. **(D)** – Glicemia aos 30 dias das administrações. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P<0,05$ ).

**Fig.2.** Fotomicrografias do parênquima hepático dos animais dos grupos experimentais. **(A)** - grupo controle (GC). **(B-C)** - grupo diabético (GD). **(D)** - grupo diabético tratado com melatonina (GDM). **(E)** - grupo diabético tratado com insulina (GDI). **(F)**- grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). Hepatócitos (**seta dupla**). Sinusóides (**S**). Veia centrolobular (**VC**). Sinusóides dilatados (**ponta de seta preta**). Microesteatose (**ponta de seta branca**). Trombo (\*). Necrose massiva (**NE**). Infiltrado inflamatório (**seta preta grossa**). Células bi-nucleadas (**seta branca grossa**). Vacuolização (**seta amarela**). Congestão leve (**estrela**). H.E.

**Fig.3.** Quantificação histoquímica no fígado dos diferentes grupos experimentais (pixels). **(A)**-Quantificação de grânulos de glicogênio. Coloração: PAS. **(B)**-Quantificação de fibras colágenas. Coloração: Sirius red. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P<0,05$ ).

**Fig.4.** Imunohistoquímica para a citocina IL-6 no fígado dos animais dos grupos experimentais. **(A)** - grupo controle (GC). **(B)** - grupo diabético (GD). **(C)** - grupo diabético tratado com melatonina (GDM). **(D)** - grupo diabético tratado com insulina (GDI). **(E)** - grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). **(F)** - Quantificação em pixels do IL-6. \*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P<0,05$ ).

**Fig.5.** Imunohistoquímica para o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no fígado dos animais dos grupos experimentais. **(A)** – grupo controle (GC). **(B)** – grupo diabético (GD). **(C)** – grupo diabético tratado com melatonina (GDM). **(D)** – grupo diabético tratado com insulina (GDI). **(E)** – grupo diabético tratado com melatonina e insulina (GDMI). **(F)** – Quantificação em pixels do TNF- $\alpha$ . \*Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P<0,05$ ).

**Fig.6.** Quantificação do status antioxidante nos diferentes grupos experimentais. **(A)** - Peroxidação lipídica (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. **(B)** - Mensuração de GSH (nmol/mg de proteína) no fígado dos animais dos grupos experimentais. \*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey ( $P<0,05$ ).

## LISTA DE QUADROS E FIGURAS

**Quadro 1. Médias  $\pm$  desvio padrão dos valores bioquímicos ao 0 dia experimental**

| Grupos                          |                   |                   |                   |                   |                   |        |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| Parâmetros                      | GC                | GD                | GDM               | GDI               | GDMI              | P      |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b> | 74,07 $\pm$ 1,00a | 71,03 $\pm$ 1,05a | 70,70 $\pm$ 0,65a | 71,47 $\pm$ 1,07a | 70,77 $\pm$ 1,64a | 0,9433 |
| <b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>   | 94,50 $\pm$ 1,5a  | 91,67 $\pm$ 2,08a | 91,17 $\pm$ 1,04a | 91,33 $\pm$ 1,52a | 92,00 $\pm$ 2,00a | 0,9372 |
| <b>HDL (mg/dL)</b>              | 21,62 $\pm$ 0,76a | 20,34 $\pm$ 0,38a | 20,33 $\pm$ 0,34a | 20,38 $\pm$ 0,86a | 19,98 $\pm$ 1,03a | 0,7444 |
| <b>AST (UI/L)</b>               | 82,28 $\pm$ 0,62a | 82,18 $\pm$ 1,80a | 82,43 $\pm$ 1,51a | 81,53 $\pm$ 0,75a | 81,43 $\pm$ 1,21a | 0,9445 |
| <b>ALT (UI/L)</b>               | 33,10 $\pm$ 0,65b | 57,62 $\pm$ 1,54a | 57,69 $\pm$ 2,14a | 56,77 $\pm$ 1,10a | 57,43 $\pm$ 0,66a | 0,0180 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas no diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Quadro 2. Médias  $\pm$  desvio-padrão dos valores bioquímicos aos 15 dias experimentais**

| Grupos                          |                   |                   |                   |                   |                   |        |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
|                                 | GC                | GD                | GDM               | GDI               | GDMI              | P      |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b> | 64,77 $\pm$ 1,40a | 66,00 $\pm$ 2,00a | 67,30 $\pm$ 1,85a | 65,00 $\pm$ 2,03a | 68,07 $\pm$ 2,22a | 0,8334 |
| <b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>   | 61,50 $\pm$ 1,50c | 86,50 $\pm$ 1,95a | 74,27 $\pm$ 1,64b | 75,80 $\pm$ 1,52b | 73,07 $\pm$ 2,68b | 0,0291 |
| <b>HDL (mg/dL)</b>              | 20,55 $\pm$ 0,42a | 19,32 $\pm$ 1,63a | 22,52 $\pm$ 0,52a | 21,60 $\pm$ 1,01a | 21,08 $\pm$ 0,80a | 0,7213 |
| <b>AST (UI/L)</b>               | 72,77 $\pm$ 2,04c | 154,2 $\pm$ 3,13a | 112,5 $\pm$ 2,24b | 118,4 $\pm$ 3,46b | 117,2 $\pm$ 3,21b | 0,0021 |
| <b>ALT (UI/L)</b>               | 36,20 $\pm$ 1,15d | 108,8 $\pm$ 1,55a | 80,47 $\pm$ 2,93b | 77,13 $\pm$ 1,80b | 54,14 $\pm$ 1,57c | 0,0198 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Quadro 3. Médias ± desvio-padrão dos valores bioquímicos aos 30 dias experimentais**

|                                 | Grupos        |               |               |               |                |        |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------|
|                                 | GC            | GD            | GDM           | GDI           | GDMI           | P      |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b> | 66,00 ± 2,08c | 85,40 ± 2,13b | 64,33 ± 2,79c | 97,13 ± 1,20a | 64,40 ± 1,63c  | 0,0183 |
| <b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>   | 73,28 ± 2,64c | 152,4 ± 2,38a | 73,83 ± 3,25c | 123,3 ± 3,29b | 68,00 ± 3,51c  | 0,0258 |
| <b>HDL (mg/dL)</b>              | 21,40 ± 0,44b | 13,46 ± 0,58c | 27,35 ± 1,05a | 19,86 ± 2,37b | 20,71 ± 3,87b  | 0,0331 |
| <b>AST (UI/L)</b>               | 104,9 ± 1,62b | 254,1 ± 3,52a | 107, ± 8,54b  | 108,4 ± 1,51b | 103,00 ± 2,54b | 0,0327 |
| <b>ALT (UI/L)</b>               | 46,00 ± 1,27b | 461,3 ± 3,05a | 48,17 ± 2,86b | 53,38 ± 4,04b | 47,67 ± 1,57b  | 0,0243 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

**Quadro 4. Médias ± desvio padrão dos hepatócitos, sinusóides, veia centrolobular, espaço porta, veia hepática e células de Kupffer no fígado dos animais dos grupos experimentais.**

| Parâmetros                | Grupos         |                |                |                |               |        |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------|
|                           | GC             | GD             | GDM            | GDI            | GDMI          | P      |
| <b>Hepatócitos</b>        | 70,76 ± 22,68a | 35,88 ± 13,32b | 69,29 ± 11,76a | 60,35 ± 11,05a | 66,88 ± 9,73a | 0,0033 |
| <b>Sinusóides</b>         | 16,76 ± 4,88b  | 32,76 ± 2,23a  | 18,82 ± 7,28b  | 21,24 ± 5,84b  | 20,82 ± 5,24b | 0,0001 |
| <b>Veia Centrolobular</b> | 8,82 ± 3,38a   | 9,23 ± 4,01a   | 5,70 ± 2,54a   | 7,11 ± 2,23a   | 5,70 ± 2,29a  | 0,0725 |
| <b>Espaço Porta</b>       | 5,47 ± 2,93a   | 7,23 ± 4,17a   | 3,52 ± 1,42a   | 3,76 ± 1,53a   | 4,29 ± 1,39a  | 0,4147 |
| <b>Veia Hepática</b>      | 3,11 ± 3,27a   | 7,76 ± 4,65a   | 2,70 ± 2,76a   | 3,70 ± 2,22a   | 2,35 ± 1,35a  | 0,4160 |
| <b>Células de Kupffer</b> | 2,88 ± 0,37a   | 3,00 ± 0,29a   | 3,87 ± 0,15a   | 2,87 ± 0,27a   | 2,72 ± 0,17a  | 0,3892 |

\*Médias seguidas pela mesma letra nas linhas não diferem entre si de acordo com o teste de Anova one-way com post-hoc de Tukey (P<0,05).

Fig.1.

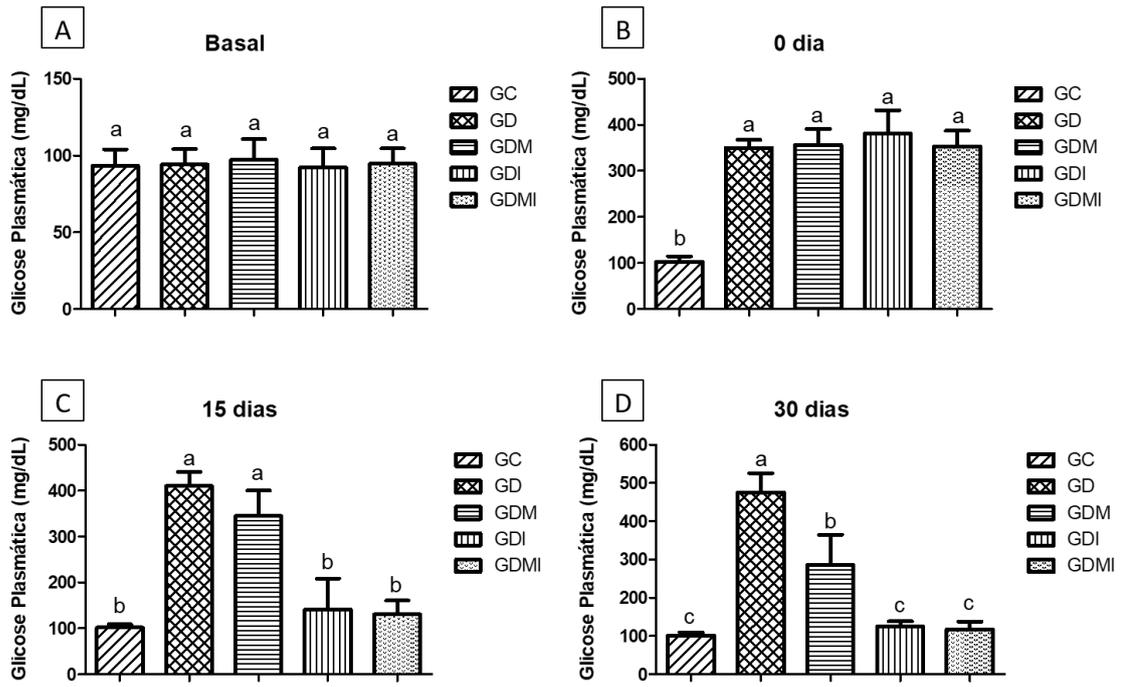


Fig.2.

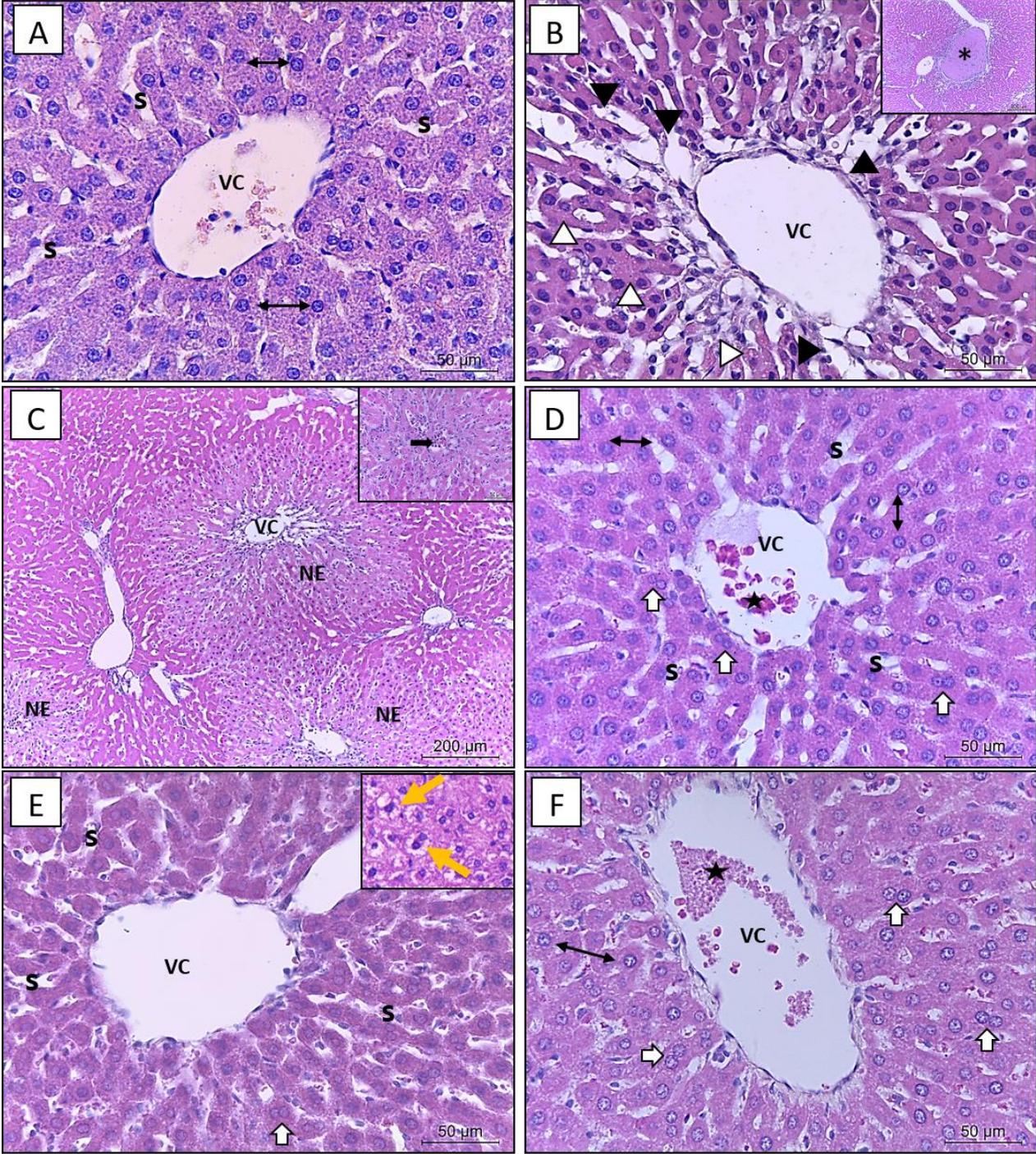


Fig.3.

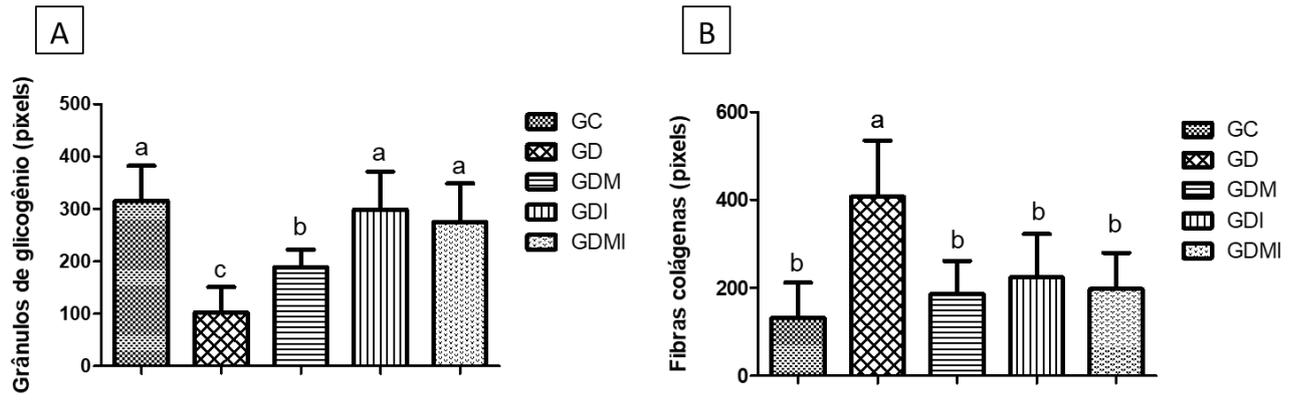


Fig.4.

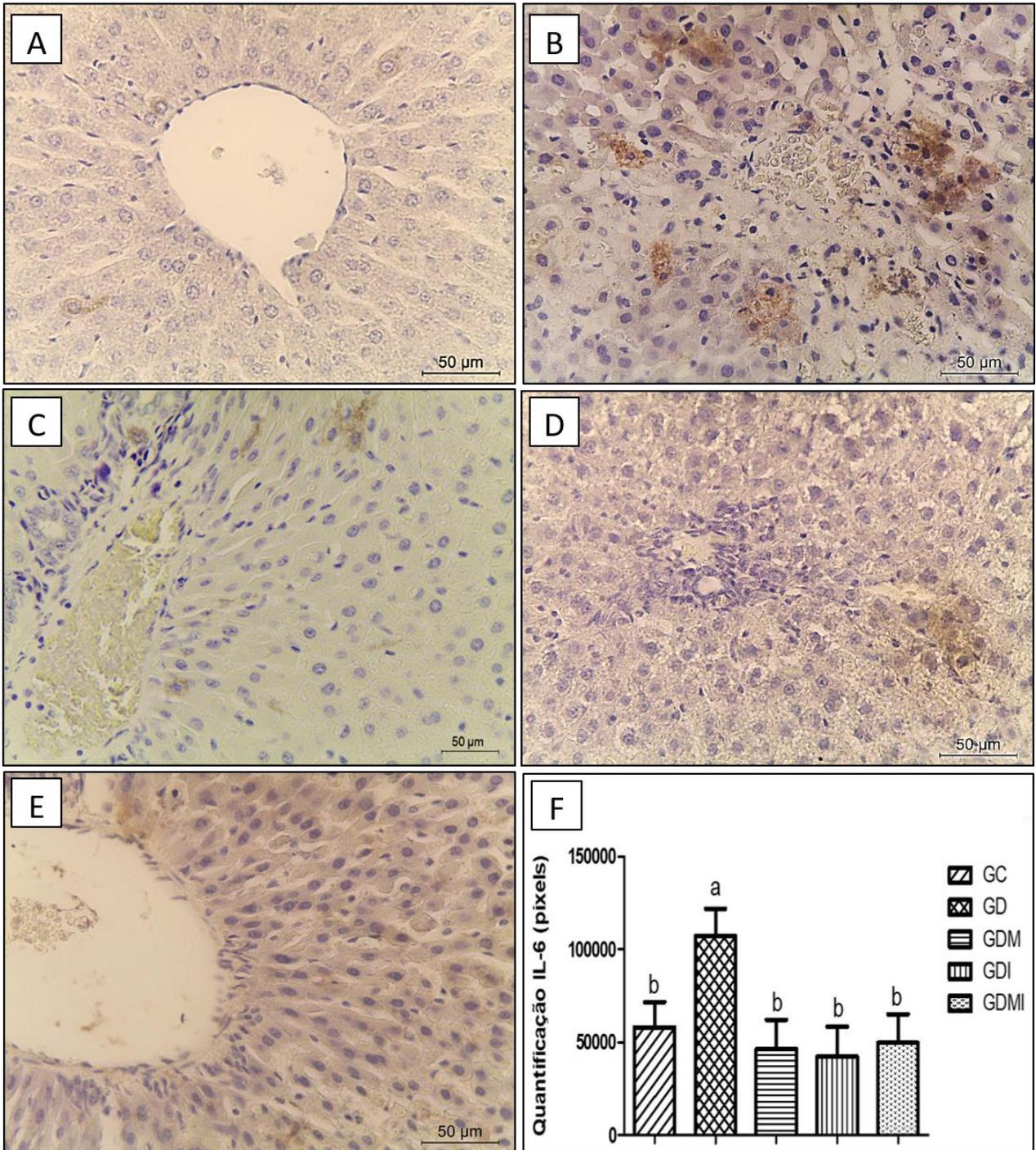


Fig.5.

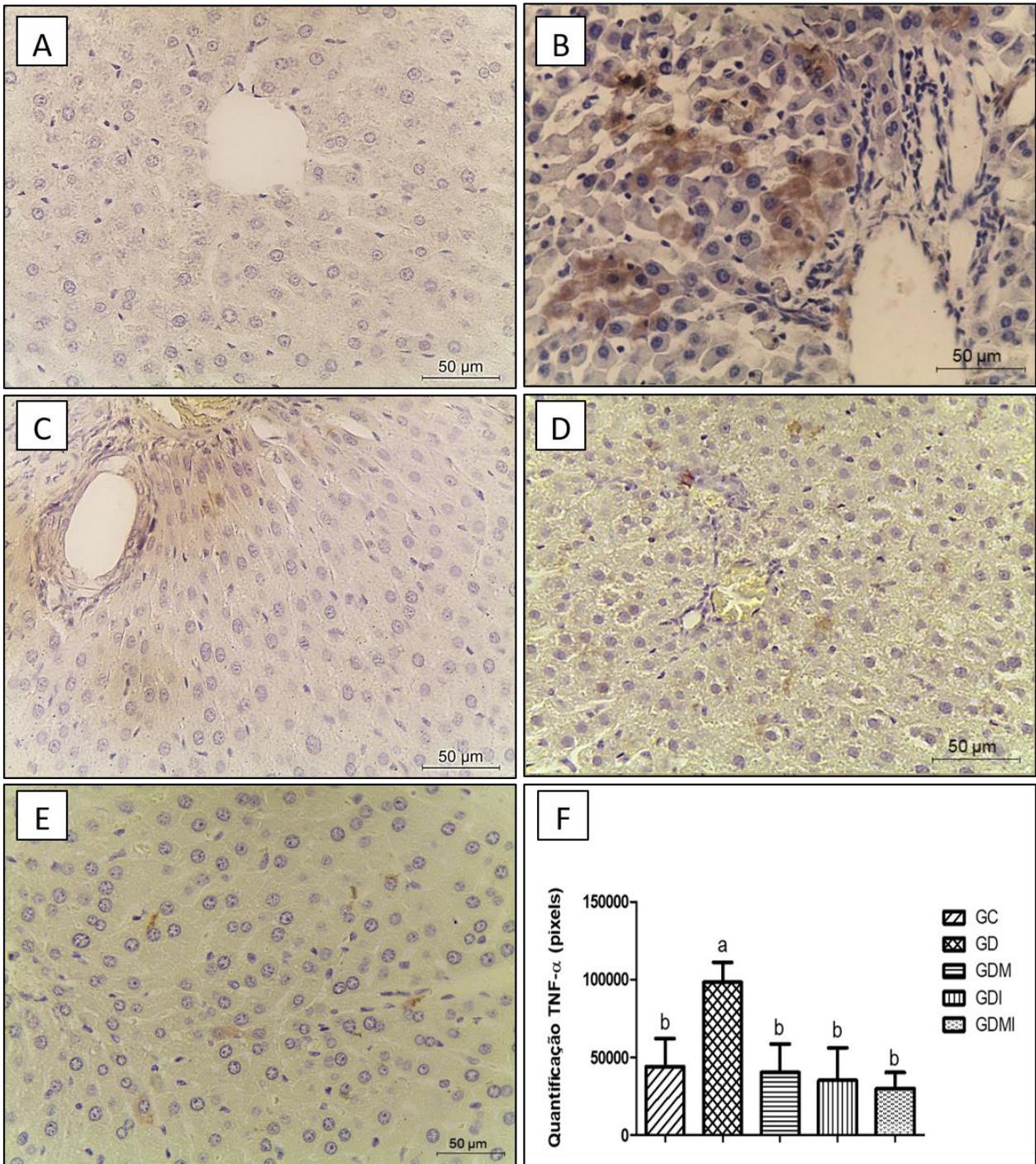


Fig.6.

