

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIECIA ANIMAL

SIMONE REGINA BARROS DE MACÊDO

**ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGIAS E MORFOMÉTRICAS RENAIIS E
HEPÁTICAS EM RATOS WISTAR DIABÉTICOS, SUBMETIDOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA E TRATADOS COM
METFORMINA, PENTOXIFILINA E MELATONINA**

RECIFE

2017

SIMONE REGINA BARROS DE MACÊDO

Alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas em ratos Wistar diabéticos, submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina

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

Orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

RECIFE

2017

SIMONE REGINA BARROS DE MACÊDO

Alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas em ratos Wistar diabéticos, submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

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

Aprovada em 24/02/17

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Andrea Alice da Fonseca oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Fabiana Felix de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Ana Katharyne Fagundes Ferreira Rossiter
Universidade Federal Rural de Pernambuco

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

M141e Macêdo, Simone Regina Barros de
 Estudo das alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas associadas ao diabetes tipo 2 e à obesidade em ratos Wistar submetidos ao tratamento com metformina, pentoxifilina e melatonina / Simone Regina Barros de Macêdo. – 2017.
 80 f.: il.

 Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Junior.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2017.
 Inclui referências.

 1. Glicose 2. Glomerulonefrite 3. Nefropatia diabética
 4. Esteatose hepática I. Silva Junior, Valdemiro Amaro da, orient.

II. Título

CDD 636.089

Dedico esta conquista a Deus.

“ Assim diz o Senhor: Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força; não se glorie o rico nas suas riquezas, mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me entender e me conhecer, que eu sou o Senhor, que faço beneficência, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o Senhor.”

(Jeremias 9:23, 24)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua presença constante em minha vida. Obrigada por tornar possível diversas conquistas, inclusive esta, por traçar o melhor caminho e não permitir que eu desistisse.

Aos meus pais, Rivaldo Macêdo e Josefa Macêdo, pelo amor incondicional, exemplo de força, humildade, caráter, integridade, persistência, resiliência e determinação. Obrigada pela dedicação e pela forma como me ensinaram a conduzir as adversidades da vida.

Agradeço a minha irmã, Patrícia Macêdo, pelo companheirismo, pelo aprendizado constante e por acreditar em mim.

A minha avó Celina Regina pelo apoio e aos meus avós Josefa Macêdo e Sebastião Macêdo *in memoriam* pelo amor e dedicação. A toda minha família pelo amor por nunca me abandonarem e por confiarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Valdemiro Amaro da Silva Junior pela confiança, por acreditar na minha capacidade, pelo exemplo de profissionalismo, pelos preciosos ensinamentos, pela orientação competente e por todas as contribuições ao longo do trabalho.

Aos meus amigos Jéssica e Alluanan os quais se disponibilizaram a me ensinar e ajudar durante as realizações dos experimentos. Obrigada vocês foram fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

A minha amiga Eulina Nery, pelo apoio e amizade, por suas sábias palavras de encorajamento.

Aos meus amigos Sandra Maria, Cássia Regina, Luiz André, Vinícius Vasconcelos, Suellen, Fabiana Felix, Jacilene, pelo companheirismo.

A todos os amigos do doutorado da Biociência Animal, por compartilharmos esse momento especial de nossas vidas.

Ao professor Frederico Celso Lyra Maia, pelo incentivo e orientação nos experimentos de análise histológica, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos e lições.

Aos funcionários do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, André e Renata pelo apoio durante o experimento.

Agradeço ainda, a todos com quem tive a oportunidade de conviver nestes anos e que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por tudo.

A farmácia Roval de manipulação e a farmacêutica Catarina Michelle de Oliveira Ferreira por terem cedido as medicações utilizadas neste estudo.

A Capes pelo apoio financeiro para a realização deste estudo.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas em ratos Wistar diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina. Para a realização dos experimentos foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade mantidos em condições de biotério no Departamento de Morfologia e Fisiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram distribuídos em aleatoriamente em cinco grupos de animais e, alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos experimentalmente ao diabetes: (GD) grupo controle diabético; (GM) grupo tratado com metformina, (GMP) tratado com metformina e pentoxifilina (100 mg/kg), (GMM) tratados com metformina (500 mg/kg) e melatonina (5 mg/kg), (GMMP) tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados e perfundidos, sendo coletados rins e fígado para análise qualitativa e quantitativa das lesões e soro sanguíneo para dosagem de ureia, creatinina, ALT, AST, ALP e GGT. Com relação às lesões histopatológicas, as mais frequentes nos rins foram glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite membranoproliferativa, atrofia glomerular, hidropsia de tubo contorcido, tubo contorcido com debris celulares, necrose e congestão. Com relação às lesões histopatológicas encontradas no fígado, as mais frequentes foram microesteatose, macroesteatose, hipertrofia de hepatócitos, estreitamento de capilares sinusoides, necrose de coagulação, congestão de veia centro-lobular, congestão do parênquima hepático, atrofia de cordões de hepatócitos e dilatação de capilares sinusoides. Quanto à histomorfometria não houve diferença no percentual de hepatócitos necróticos, hepatócitos mononucleares, hepatócitos binucleado, vasos sanguíneos e ductos biliares, células de Kupffer. Com relação ao percentual de capilares sinusoides, o grupo tratado com metformina associada à melatonina apresentou valor maior estatisticamente que os demais grupos. As concentrações séricas de ureia não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle. Porém, os valores médios dos animais tratados permaneceram acima dos padrões da normalidade para espécie. Os animais diabéticos submetidos e tratados com metformina + pentoxifilina e a associação destas com a melatonina proporcionaram uma tendência de redução dos valores dos níveis séricos de ureia em relação aos animais diabéticos sem tratamento. Em relação à albumina também não foi possível constatar diferença estatística entre os grupos. Os valores de creatinina nos grupos tratados com metformina+melatonina e a associação entre metformina+pentoxifilina+melanina tiveram redução estatisticamente significativa de 62% e 67%, respectivamente, em relação ao grupo diabético sem tratamento. Conclui-se que a pentoxifilina potencializa a redução dos níveis glicêmicos decorrentes da administração de metformina. No entanto, não é capaz de reduzir as lesões glomerulares e hepáticas decorrentes do diabetes e a administração de dieta hiperlipídica. A metformina associada a melatonina ou em associação com pentoxifilina e melatonina, protege o parênquima renal de lesões histopatológicas e reduz os níveis séricos de creatinina, além de influenciar na redução dos níveis séricos de ALT e nos danos compatíveis com a doença hepática gordurosa não alcoólica em animais diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica.

Palavras chave: Nefropatia diabética. Esteatose hepática. Diabetes. Glicose. Hiperlipídica.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the histopathological and morphometric changes in renal and hepatic patients in diabetic Wistar rats submitted to the hyperlipidic diet and treated with metformin, pentoxifylline and melatonin. For the experiments were performed 25 male Wistar rats, 30 days old, kept under animal conditions in the Department of Morphology and Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco. These animals were randomly distributed in five groups of animals and fed a hyperlipid diet and experimentally induced to diabetes: (GD) diabetic control group (GMP) treated with metformin (500 mg/kg) and melatonin (5 mg/kg), treated with metformin (GMP) treated with metformin and metformin (100 mg/kg) Pentoxifylline and melatonin. At the end of the experimental period, the animals were anesthetized and perfused, and the kidneys and liver were collected for qualitative and quantitative analysis of the lesions and blood serum for the determination of urea, creatinine, ALT, AST, ALP and GGT. With respect to histopathological lesions, the most frequent in the kidneys were membranous glomerulonephritis, proliferative glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis, glomerular atrophy, contorted tube hydropsy, tube deformed with cellular debris, necrosis and congestion. The most frequent histopathological lesions in the liver were microsteatosis, macrosteatosis, hepatocyte hypertrophy, narrowing of sinusoidal capillaries, coagulation necrosis, central lobular vein congestion, hepatic parenchyma congestion, hepatocyte cord atrophy, and dilatation of Sinusoidal capillaries. As for histomorphometry there was no difference in the percentage of necrotic hepatocytes, mononuclear hepatocytes, binucleated hepatocytes, blood vessels and bile ducts, Kupffer cells. Regarding the percentage of sinusoidal capillaries, the group treated with metformin associated with melatonin presented statistically higher value than the other groups. Serum urea concentrations were not statistically different between the treated groups and the control group. However, the mean values of the treated animals remained above normal for species. Diabetic animals submitted and treated with metformin + pentoxifylline and the association of these with melatonin provided a tendency to reduce serum urea levels in relation to untreated diabetic animals. No statistical difference was found between groups either. The creatinine values in the groups treated with metformin + melatonin and the association between metformin + pentoxifylline + melanin had a statistically significant reduction of 62% and 67%, respectively, in relation to the untreated diabetic group. It is concluded that pentoxifylline potentiates the reduction of the glycemic levels resulting from the administration of metformin. However, it is not able to reduce the glomerular and hepatic lesions due to diabetes and the administration of a hyperlipidic diet. Metformin associated with melatonin or in combination with pentoxifylline and melatonin protects the renal parenchyma from histopathological lesions and reduces serum creatinine levels, in addition to influencing the reduction of serum ALT levels and damage compatible with non-alcoholic fatty liver disease in Diabetic animals submitted to the hyperlipidic diet.

Keywords: Diabetic nephropathy. Hepatic steatosis. Diabetes. Glucose. Hyperlipidemic.

LISTA DE TABELAS

SEÇÃO 2

Tabela 1	Lista de ingredientes utilizados para a preparação da dieta rica em lipídios.....	36
Tabela 2	Peso corporal (g) e renal (g) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	39
Tabela 3	Concentrações séricas de ureia, creatinina e albumina (mg/dL) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	41
Tabela 4	Medidas de diâmetro glomerular (μm), área capsular (μm^2), área subcapsular (μm^2) e área de tufo glomerular (μm^2) de rim de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e submetidos e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	43
Tabela 5	Frequência das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	45
Tabela 6	Intensidade das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	46

SEÇÃO 3

Tabela 1	Lista de ingredientes utilizados para a preparação da dieta rica em lipídios.....	62
Tabela 2	Concentrações séricas de ALT, AST, GGT e ALP (U/L) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	66

Tabela 3	Peso corporal, hepático (g) e níveis de glicose (ng/dL) de ratos Wistar adultos induzidos experimentalmente ao diabetes e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	66
Tabela 4	Densidade volumétrica dos componentes hepáticos de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina.....	67
Tabela 5	Densidade volumétrica dos componentes hepáticos de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	68
Tabela 6	Intensidade das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	71
Tabela 7	Frequência das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	71

LISTA DE FIGURAS

SEÇÃO 2

Figura 1	Concentrações séricas de ureia, creatinina e albumina (mg/dL) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	42
Figura 2	Medidas de diâmetro glomerular (μm), área subcapsular, área da cápsula de Bowman e área do tufo glomerular (μm^2) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	44
Figura 3	Fotomicrografia do parênquima renal de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina - HE, Tricrômico e Gomori.....	49
Figura 4	Fotomicrografia do parênquima renal de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina - HE, Tricrômico Gomori.....	50

SEÇÃO 3

Figura 1	Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	68
Figura 2	Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos (capilares sinusoides, células de Kupffer, vasos sanguíneos, ducto biliar e tecido conjuntivo) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.....	69

- Figura 3 Fotomicrografia de fígado ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina - HE, PAS, Tricrômico de Gomori..... 74
- Figura 4 Fotomicrografia de fígado ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina - HE..... 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
AGes	Produtos finais de glicação avançada
ALT	Alanina aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
AMPK	Proteína ativada por adenosina monofostato
AMP	Adenosina monofostato
AMPK	Adenosina monofostato
ANOVA	Análise de variância
AA-NAT	N-Acetiltransferase
ATP	Adenosina trifostato
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GLUT	Transportador de glicose
GGT	Gama glutamil transferase
g	Gramas
HIONT	Hidroxil-indol-O-metiltransferase
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IRC	Insuficiência renal crônica
IRS	Substrato receptor de insulina
NAS	N-acetiltransferase
P	Nível de significância estatístico
PI3-quinase	Fosfatidilinositol 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
TNF- α	Fator de necrose tumoral
%	Percentual
®	Marca registrada
Kg	Quilograma
μ m	Micrômetro
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

SEÇÃO 1

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	DIABETES MELLITUS.....	20
2.1	DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	20
2.2	DIABETES MELLITUS TIPO 2	20
2.4	OBESIDADE	22
2.5	NEFROPATIA DIABÉTICA.....	23
2.6	TRATAMENTO DA DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	24
2.6.1	Metformina	24
2.6.2	Pentoxifilina	25
2.6.3	Melatonina	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
	REFERÊNCIAS.....	27

SEÇÃO 2

	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE RIM DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS COM METFORMINA, PENTOXIFILINA E MELATONINA	31
	RESUMO	32
	ABSTRACT.....	33
1	INTRODUÇÃO.....	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35

2.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	36
2.3	PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	37
2.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS GLOMÉRULOS.....	37
2.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	38
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4	RESULTADO E DISCUSSÃO	38
4.1	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	39
4.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GLOMÉRULOS.....	42
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS RINS.....	44
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52

SEÇÃO 3

	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE FÍGADO DE RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS COM METFORMINA, PENTOXIFILINA E MELATONINA.....	57
	RESUMO.....	58
	ABSTRACT.....	59
1	INTRODUÇÃO.....	60
2	MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	61
2.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	62
2.3	PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	63
2.4	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO FÍGADO	63
2.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	64
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

4.1	AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	64
4.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO FÍGADO	67
4.3	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO	70
5	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

SEÇÃO 1

1 INTRODUÇÃO

O excesso de peso corporal, incluindo o sobrepeso e a obesidade, é um dos principais problemas mundiais de saúde pública da atualidade. A obesidade é uma condição que gera aumento no risco de morbidade para diversas doenças crônicas, tais como a hipertensão arterial, as dislipidemias, o diabetes tipo 2, a doença coronariana e alguns tipos de câncer. Sua prevenção e tratamento são grandes desafios para a atual geração (RUIZ et al., 2009).

O diabetes mellitus é uma doença milenar que se tornou um dos principais problemas de saúde mundial (TAVEIRA et al., 2008), consiste em uma síndrome que pode ser definida como uma condição de distúrbios metabólicos heterogêneos caracterizados por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção e ação da insulina, ou ambos (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2014). Segundo Leahy (2005), a deficiência de insulina resulta em níveis elevados de glicose sanguínea, que, por sua vez, pode causar prejuízos em vários sistemas do organismo, lesões, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014).

Conforme a ADA (2012), o diabetes mellitus é classificado em tipo 1 (DM1), insulino-dependente, que ocorre por destruição das células β do pâncreas, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina e diabetes tipo 2 (DM2), não insulino-dependente, que ocorre por resistência à insulina e deficiência de insulina; outros tipos específicos de diabetes provenientes de outras causas, tais como defeitos genéticos do funcionamento das células β do pâncreas ou da ação da insulina, doenças exógenas ou endógenas que danifiquem o pâncreas, indução por drogas ou produtos químicos, infecções e formas incomuns de diabetes mellitus gestacional.

Estima-se que até 2030, 366 milhões de pessoas no mundo terão diabetes. No Brasil, o número de pessoas acometidas passará de 4,5 para 11,3 milhões, ocupando assim a oitava posição entre os países com maior número de pessoas com a doença (FREITAS e GARCIA, 2008). Atualmente, o DM2 é um dos principais agravos de saúde pública em nível global, tendo grande impacto na economia dos governos e dos indivíduos portadores (ASHCROFT; RORSMAN, 2012), constitui-se a forma mais comum da doença, representando cerca de 90% dos casos e seu surgimento está correlacionado a hábitos de

vida inadequados, os quais prejudicam a ação e produção da insulina ou predisõem a resistência à mesma (MAZZINI et al., 2013).

Prejuízos associados à hiperglicemia crônica possuem relação direta com o desenvolvimento das diversas complicações micro e macrovasculares relacionadas ao DM (MADONNA; DE CATERINA, 2011; FORBES; COOPER, 2013). Como manifestações frequentes, pode-se citar a aterosclerose, retinopatia, nefropatia e a neuropatia periférica. A combinação de má circulação, neuropatia e dificuldade de cicatrização de feridas aumenta significativamente o risco de amputação de membros (ABDULLAH et al., 2014).

Portanto, as complicações de órgãos secundária o diabetes, especialmente micro e macro complicações vasculares serão alvo das mais importantes preocupações médicas no futuro próximo. Devido a isso, um número crescente de pesquisas concentraram-se em diabetes e suas complicações, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos patogênicos e fisiopatológicos, estratégias preventivas e de potenciais novas terapias.

Diversos agentes com mecanismos distintos são utilizados no tratamento, são eles: biguanidas (metformina, amplamente usado), tiazolidinedionas (pioglitazona), sulfonilureias, inibidores da alfa-glicosidase, inibidores da proteína cotransportadora de sódio/glicose 2 (SGLT2) e, os inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) (WOOK & JOSEPHINE, 2008). A metformina atualmente é um dos principais fármacos no tratamento da DM2, devido ao seu perfil de toxicidade favorável e eficácia clínica. Esse fármaco reduz os níveis de glicose principalmente diminuindo a gliconeogênese hepática, o que leva a um declínio médio nos níveis de insulina e também promove a captação de glicose no músculo (ALEXANDER et al., 2008).

A hiperglicemia tem ligação com a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) formadas através da redução de um ou dois elétrons de oxigênio (O_2). Nesse sentido, as ERO podem ser prejudiciais para as células porque reagem com ácidos graxos insaturados das membranas plasmáticas produzindo peróxidos lipídicos resultando na diminuição da fluidez da membrana. Em situações de estresse, nosso organismo gera desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes para se proteger, resultando no quadro de estresse oxidativo (DALLACQUA; DAMASCENO, 2011). Dentre os antioxidantes naturais tem-se a melatonina que é um hormônio produzido, principalmente, pelas células da pineal, durante o período noturno, desempenhando função no controle do

ritmo circadiano. Além disso, vários estudos demonstram o alto poder antioxidante e anti-apoptótico do referido hormônio. Em indivíduos diabéticos, a melatonina, por possuir relação antagônica com os níveis circulantes de insulina, encontra-se normalmente em baixas concentrações.

Por esse motivo, o uso de melatonina exógena tem se mostrado importante para manutenção da proteção antioxidante do organismo de animais diabéticos além de ter influência na melhoria da sensibilidade à insulina e controle glicêmico.

A pentoxifilina é um inibidor não seletivo da fosfodiesterase, derivado da metilxantina, com efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (RENKE et al., 2010). Estudos realizados com a pentoxifilina obtiveram resultados positivos no tratamento da nefropatia diabética e de outras patologias inflamatórias (LEYVA-JIMÉNEZ et al., 2009).

A atual pandemia de diabetes mellitus tem estimulado a realização de pesquisas para elucidar a fisiopatologia da doença, a fim de que haja melhora na detecção, na prevenção e no tratamento das complicações associadas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas renais e hepáticas em ratos Wistar diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica crônica de múltiplas etiologias, causada pela falta de produção de insulina pelas células beta (β)-pancreáticas ou pelo defeito nos receptores de insulina nas células-alvo, resultando em doença metabólica hiperglicêmica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA, 2009).

O diabetes mellitus (DM) está entre as principais causas de morbimortalidade. Observa-se mundialmente um rápido aumento em sua prevalência, especialmente entre os países em desenvolvimento (GUARIGUATA et al., 2011). No Brasil, em 2010, a prevalência geral estimada, incluindo DM tipos 1 (DM1) e 2 (DM2) entre adultos, foi de 6,4% (aproximadamente 12 milhões). Destaca-se, no entanto, que o aumento da prevalência da doença é verificado em todo o mundo. Havia 371 milhões de diabéticos no

mundo em 2012. Estima-se que, em 2030, cerca de 552 milhões de pessoas terão diabetes (IDF, 2012).

2.2 DIABETES TIPO 1

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença crônica multifatorial, presente em 5 a 10% dos casos dessa doença, causada pela destruição autoimune parcial ou total das células betapancreáticas, que resulta na incapacidade progressiva de produzir insulina. Esse processo pode levar meses ou anos, mas só aparece clinicamente após a destruição de pelo menos 80% da massa de ilhotas. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; FRAGUAS; SOARES; BRONSTEIN, 2009).

O desencadeamento da autoimunidade contra a célula beta é causado, provavelmente, por agentes ambientais que atuam quando existe predisposição genética. Uma vez ativadas, células imunes invadem as ilhotas, provocando efeitos deletérios que levam a apoptose dessas células. Em geral, o desenvolvimento dessa autoimunidade e o aparecimento da doença ocorrem de forma abrupta e podem levar à falência total ou quase total das células beta pancreáticas. (PIROT; CARDOZ; EIZIRIK, 2008).

O DM1 promove diversas consequências resultantes de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunções e insuficiências em diferentes órgãos. Dentre as complicações agudas, destacam-se a cetoacidose diabética, a hipoglicemia e a convulsão (BEM; KUNDE, 2006; ADA, 2010; OLIVEITA et al., 2010). Dentre as complicações crônicas, ressaltam-se a nefropatia, a retinopatia, a artropatia, a neuropatia periférica e a neuropatia autonômica diabética (BEM; KUNDE, 2006; ADA, 2010; RHEE et al., 2011).

2.3 DIABETES TIPO 2

O diabetes mellitus do tipo 2 é uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia resultante tanto da resistência à insulina quanto da deficiência na secreção desse hormônio (GOIS et al., 2012). No início da doença, em resposta a esta resistência, ocorre hiperinsulinemia compensatória, continuando por meses ou anos. Com o avanço do DM2, por causa da disfunção e redução das células β

pancreáticas, a síntese e a secreção de insulina poderão ficar comprometidas (MATTHAEI et al., 2000; MCLELLAN et al., 2007)

Dentre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença podem ser citadas algumas irregularidades metabólicas ou hormonais, as quais contribuem para o desenvolvimento da hiperglicemia: a baixa secreção de insulina, o efeito diminuído da incretina, alta lipólise, reabsorção de glicose nos rins, baixa reabsorção de glicose no músculo esquelético, disfunção de neurotransmissores, produção hepática de glicose aumentada e aumento na secreção de glucagon (DEFRONZO et al., 2012).

Sabe-se que a DM2 é a mais frequentemente diagnosticada nas populações, correspondendo a cerca de 90% dos casos de DM. Fatores genéticos e ambientais encontram-se fortemente relacionados à patologia. Esses últimos relacionam-se em grande parte com as alterações nos estilos de vida (hábitos alimentares inadequados, sedentarismo, etc.) observadas nas últimas décadas (SHAW et al., 2010; IDF, 2013; SBD, 2014), as quais contribuem, particularmente para a obesidade, reconhecida como eixo central no desenvolvimento da resistência à insulina (JANSSEN, KATZMARZYK; ROSS, 2002; MENEZES et al., 2014) e como o principal fator associado à DM2 (SCHEEN, 2005; SICREE; SHAW, 2007; ADA, 2007; DEFRONZO; TRIPATHY, 2009; SHAW et al., 2010).

2.4 OBESIDADE

A obesidade é um processo de doença caracterizada pelo acúmulo de gordura corporal excessiva, com uma complexa etiologia genética-ambiental, resultando em múltiplas consequências patológicas específicas nos órgãos (HAN et al., 2013). A prevalência da obesidade vem aumentando nas últimas décadas em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos, acometendo também aqueles em desenvolvimento, como o Brasil (SCHMIDT et al., 2011).

No Brasil, segundo os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), a obesidade e o excesso de peso têm aumentado rapidamente nos últimos anos, em todas as faixas etárias. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres são encontrados com excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das

mulheres são considerados obesos. Entre as crianças, 33,5% de crianças entre cinco a nove anos apresentam excesso de peso, sendo que 16,6% do gênero masculino e 11,8 % do feminino eram obesos. Estes dados despertam um alerta já que, a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 são condições crônicas estreitamente inter-relacionadas.

Segundo a American Diabetes Association (ADA, 2014), a maioria dos indivíduos com DM2 são obesos ou apresentam níveis elevados de gordura abdominal. Por essa razão, esses indivíduos desenvolvem algum grau de resistência à insulina nos tecidos periféricos (fígado, músculo, tecido adiposo e miocárdio), conduzindo aos primeiros sinais da manifestação da diabetes. Mundialmente, em 2014, estimou-se que 422 milhões de adultos estavam vivendo com diabetes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

2.5 NEFROPATIA DIABÉTICA

A nefropatia diabética ocorre em 20 a 40% dos pacientes com diabetes mellitus e é uma das complicações crônicas do diabetes mellitus que está associada a um aumento de mortalidade, principalmente relacionado à doença cardiovascular (ADA, 2010). A fisiopatologia da doença renal diabética é complexa, abrangendo fatores hemodinâmicos, concentração plasmática dos produtos finais de glicolisação avançada, disfunção endotelial, entre outros, e os principais fatores de risco são hiperglicemia, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e susceptibilidade genética (ZANATTA et al., 2008). No entanto, a dislipidemia e posterior lipotoxicidade desempenham um importante papel no desenvolvimento deste processo patológico (ATHYROS et al., 2010; RUTLEDGE et al., 2010; KIM et al., 2013). Níveis elevados de lipoproteínas plasmáticas também estão associados com o alto risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares, além de nefropatias em pacientes diabéticos (JUNG et al., 2014; TORO et al., 2015).

A nefropatia diabética é uma complicação crônica microvascular que compromete a função renal, especificamente os glomérulos renais, por aumento da membrana basal glomerular, espessamento da membrana basal tubular e esclerose mesangial difusa. Estas alterações fisiológicas conduzem a insuficiência renal crônica (IRC), com macroalbuminúria ou proteinúria persistente. O processo de esclerose dos glomérulos renais inicia-se com a multiplicação das células mesangiais, nas quais o transporte de glicose para o meio intracelular não diminui com a hiperglicemia crônica, causando maior

concentração citoplasmática de glicose (MURUSSI et al., 2003; BROWNLEE, 2005; GROSS et al., 2005; LAGRANHA et al., 2007; ZANNATA et al., 2008).

A célula mesangial glomerular participa na manutenção da estrutura e do funcionamento fisiológico do glomérulo renal. A glicose do meio extracelular passa para o citoplasma da célula mesangial por difusão facilitada, mediado por transportador de glicose (GLUT). O excesso de glicose no meio intracelular ativa a via da PKC (proteína quinase C), estimulando a síntese de proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, laminina, tenascina e o colágeno. Por causa do aumento da produção celular, ocorre acúmulo de componentes proteicos na matriz extracelular do glomérulo renal, principalmente de colágeno (tipo I e III) e tenascina, com consequente modificação da matriz mesangial e formação do glomérulo renal esclerótico (LAGRANHA et al., 2007; ZANNATA et al., 2008).

2.6 TRATAMENTO DA DIABETES MELLITUS

2.6.1 Metformina

A metformina é o fármaco de primeira escolha para tratamento de DM2, sendo o anti-hiperglicemiante oral mais amplamente prescrito, devido ao seu perfil de toxicidade favorável e eficácia clínica. O cloridrato de metformina é um derivado da guanidina, composto ativo da *Galega officinalis*. Essa planta medicinal, tendo como sinonímia popular *Lilac* francês, foi usada por séculos na Europa como tratamento do diabetes desde a época medieval (GRAHAM et al., 2011). O fármaco reduz os níveis de glicose principalmente diminuindo a gliconeogênese hepática, o que leva a um declínio médio nos níveis de insulina, e também promove a captação de glicose no músculo (ALEXANDER et al., 2008; BRASIL, 2010).

A metformina exerce os seus efeitos através do aumento da sensibilidade à insulina e da diminuição da produção hepática e absorção intestinal de glicose, o que em teoria é benéfico para a preservação das células pancreáticas- β (WAHEED, MALIK; MAZHAR, 2013). Os seus efeitos são exercidos pela inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (BERTOLDO et al., 2014), levando a maior produção de ATP e, conseqüentemente, de AMP. Este ativa a proteína-cinase ativada por (AMP) adenosina

monofosfato (AMPK), que está frequentemente inativada na obesidade e insulinoresistência (SIVALINGAM et al., 2014).

2.6.2 Pentoxifilina

A pentoxifilina 3,7 dimetil-1 (5'- oxo-hexil) é um inibidor não seletivo da fosfodilesterase, derivado da metilxantina, com propriedades imunomoduladoras, incluindo a regulação negativa da síntese de Fator de necrose tumoral (TNF- α) e inibição da apoptose, proliferação celular e trombose (RENKE et al., 2010). A pentoxifilina, originalmente, era usada como um fármaco hemorreológico. No entanto, ao ser constatado o seu potencial antiinflamatório, passou a ser clinicamente utilizada para tratar um amplo espectro de patologias inflamatórias, incluindo hepatite, esteatose hepática, doença renal e artrite reumatoide. Com efeitos antiinflamatórios a pentoxifilina atua no alívio de dor inflamatória experimental, na prevenção da migração de neutrófilos e na redução do estresse oxidativo (SUNIL et al., 2014; QUEIROZ-JUNIOR et al., 2013; SEDGER; MECDERMOTT, 2014).

2.6.3 Melatonina

A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano que é captado da circulação e transformado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) através da enzima triptofano hidroxilase 1 (TPH1). O 5-HTP é descarboxilado pela enzima 5-HTP descarboxilase gerando a serotonina que é metabolizada durante o período escuro à acetilserotonina (NAS) pela ação da enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AA-NAT). Posteriormente a NAS é utilizada como substrato para enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIONT), sendo o produto final a melatonina (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Embora os níveis de glicose e insulina estejam relacionados à alimentação, existe uma variação circadiana, que indica também a participação de fatores endógenos, como a melatonina, que funcionaria como um mediador na regulação dos níveis sanguíneos de glicose e insulina. Portanto, a ausência ou diminuição de secreção de melatonina, em decorrência, por exemplo da exposição ao trabalho noturno, altera essa organização temporal das funções metabólicas (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as alterações histopatológica e morfométricas renais e hepáticas em ratos Wistar diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

3.2 ESPECÍFICOS

- Quantificar parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina e albumina dos animais experimentais.
- Avaliar a integridade hepática pela dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ASL), gama glutamil transferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP).
- Analisar os seguintes parâmetros morfométricos: área do glomérulo, área da cápsula de Bowman, área do espaço subcapsular.
- Determinar a proporção dos componentes hepáticos (hepátocitos mononucleados, binucleados, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e células de Kupffer).
- Realizar a análise histopatológica e do tecido renal de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, melatonina e pentoxilina.
- Realizar a análise histopatológica e do tecido hepático de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, melatonina e pentoxilina.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N. et al. The architecture of risk for type 2 diabetes: understanding Asia in the context of global Findings. **Int. J. Endocrinol.**, p. 1-21, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA), Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, n. 1, p. 64- 71, 2012.
- ALEXANDER, G. C. et al. National trends in treatment of type 2 diabetes mellitus, 1994-2007. **Arch. Intern. Med.**, v. 168, p. 2088-2094, 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p. 45-65. 2007.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 81-90, 2014.
- ANDRADE, O. V. B.; IHARA, F. O. Z.; TROSTER, E. J. Metabolic acidosis in childhood: why, when and how to treat. **J. Pediatr.**, v. 83, n. 2, p.11-21, 2007.
- ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, p. 1160-1171, 2012
- ATHYROS, V. G. et al. Impact of managing atherogenic dyslipidemia on cardiovascular outcome across different stages of diabetic nephropathy. **Expert. Opin. Pharmacother.**, v. 11, n. 5. p. 723– 730, 2010
- BERTOLDO, M. J. et al. Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. **Ann. Transl. Med.** v. 2, n. 55, p.1-13, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813-20, 2001.
- BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1615-1625, 2005.
- BUGGER, H.; ABEL, E. D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Dis. Model Mech.**, v. 2, n. 9-10, p. 454-466, 2009.
- CIPOLLA-NETO, J. et al. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **J. Pineal Res.**, v. 56, n. 4, p. 371–381, 2014.
- CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep. Med. Rev.** v.9, p. 11-24, 2005.

DALLAQUA, B; DAMASCENO, D.C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Rev. Bras. Pl. Med.** Botucatu, v.13, n.3, p.367-373, 2011.

DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n.2, p. 157-63, 2009.

EL-ATAT, F. A. et al. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 15, n. 11, p. 2816-2827, 2004.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD) 2013-2014. Itapeví, Brasil: AC Farmacêutica, 2014.

FERNANDES, J. L. et al. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases antiinflammatory activity in patients with coronary artery disease a randomized placebo-controlled study. **Atherosclerosis**, v. 196, n. 1, p. 157-163, 2008.

FREITAS, L. R. S.; GARCIA, L. P. Evolution of prevalence of diabetes and associated hypertension in Brazil: analysis of National Household Sample Survey, 1998, 2003 and 2008. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.21, n.1, p. 7-19, 2012.

GUARIGUATA, L. et al. The International diabetes federation diabetes atlas methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, n. 3, p. 322-332. 2011.

GOIS, C. et al. The relationship between temperament, diabetes and depression. **J. Affect. Disord.**, v. 142, p. 67-71, 2012.

GRAHAM, G. G. et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 50, n. 2, p. 81-98, 2011.

GROSS, J. L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, p. 164-76, 2005.

IDF. IDF Diabetes Atlas, 6th ed. Brussels, Belgium: IDF, 2013. International Diabetes Federation [Internet]. Diabetes Atlas. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/the-global-burden>>. Acesso em 18 Set 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 2 fev. 2016.

JANSSEN, I.; KATZMARZYK, P. T; ROSS, R. Body mass index, waist circumference, and health risk: evidence in support of current National Institutes of Health guidelines. **Arch. Intern. Med.**, v, 162, n.18, p. 2074-2079, 2002.

JUNG, C. H. et al. Differential associations of central and brachial blood pressure with carotid atherosclerosis and microvascular complications in patients with type 2 diabetes. **BMC Card. Disord.**, v. 14, n. 1, p. 23, 2014.

- KIM, M. Y. et al. Resveratrol prevents renal lipotoxicity and inhibits mesangial cell glucotoxicity in a manner dependent on the AMPKSIRT1-PGC1alpha axis in db/db mice. **Diabetologia**, v. 56, p. 204–217, 2013.
- LAGRANHA, C. J. et al. Bases moleculares da glomerulopatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 51, n. 6, p. 901-912, 2007.
- LEAHY, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Arch. Med. Res.**, v. 36, p. 197-209, 2005.
- LEYVA-JIMÉNEZ, R. et al. Efecto de la pentoxifilina sobre la evolución de la nefropatía diabética. **Med. Clin.**, v. 132, n. 20, p. 772-778, 2009.
- MATTHAEI, S. et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 6, p.585-618, 2000.
- MAZZINI, M. C. R. et al. Rastreamento do risco de desenvolvimento de diabetes mellitus em pais de estudantes de uma escola privada na cidade de Jundiaí. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 59, n. 2, p. 136-142, 2013.
- MCLELLAN, K. C. P, et al. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Rev. Nutr.**, v. 20, n. 5, p. 515-24, 2007.
- MENEZES, T. N. et al. Abdominal obesity: a critical review of the measurement techniques and cutoff points of anthropometric indicators adopted in Brazil. **Cien. Saúde Colet.**, v. 19, n. 6, p. 1741-54. 2014
- MIDDENDORF, P. J.; WILLIAMS, P.L. Nephrotoxicity: toxic responses of the Kidney. In: WILLIAMS, P. L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. A Wiley-Interscience Publication, Second Edition. New York, cap. 5, p. 120- 25, 2000.
- MURUSSI, M., et al. Nefropatia diabética no diabete melito tipo 2: fatores de risco e prevenção. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, p. 207-219, 2003.
- QUEIROZ-JUNIOR, C. M. et al. Preventive and therapeutic anti-TNF- α therapy with pentoxifylline decreases arthritis and the associated periodontal co-morbidity in mice. **Life Sci.**, v. 93, n. 9-11, p. 423-428. 2013.
- RENKE, M. et al. Effect of pentoxifylline on proteinuria, markers of tubular injury and oxidative stress in non-diabetic patients with chronic kidney disease - placebo controlled, randomized, cross-over study. **Acta Biochim. Pol.**, v. 57, n. 1. p. 119-123, 2010.
- RUIZ. J. R. et al. Predictive validity of health-related fitness in youth: a systematic review. **Br. J. Sports Med.**, v. 43, p. 909- 923, 2009.
- RUTLEDGE et al. Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy. **Nat. Rev. Nephrol.**, v. 6, p. 361–370. 2010

- SCHEEN, A. J. Diabetes mellitus in the elderly: insulin resistance and/or impaired insulin secretion? **Diabetes Metab.**, v. 31, n. 2, p. 27-34, 2005.
- SCHMIDT, M. I.; et al. Chronic noncommunicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 4, p. 1949-1960, 2011.
- SEDDER, L. M.; McDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 25, n. 4, p. 453-472, 2014.
- SHAW, J.; S. M. et al. Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. **Eur. J. Heart Fail.**, v. 11, n. 2, p.113-118, 2009.
- SICREE, R.; SHAW, J. Type 2 diabetes: an epidemic or not, and why it is happening. **Diabetes Metabolic Syndrome: Clin. Research Reviews**, v. 9, n. 2, p.75- 81, 2007.
- SIVALIGAM, V. N. et al. Metformin in reproductive health, pregnancy and gynaecological cancer: established and emerging indications. **Hum. Reprod. Update**, v. 20, n. 6, p. 853-868, 2014.
- SUNIL, V. R. et al. Pentoxifylline attenuates nitrogen mustard-induced acute lung injury, oxidative stress and inflammation. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 97, n. 1, p. 89-98, 2014.
- TAVEIRA, B. A. et al. Controle glicêmico através do exercício de força em indivíduo portador de diabetes tipo 1. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**. São Paulo, v. 2, n.9, p.271-279, 2008.
- TORO, R. et al. Relationship between lipoprotein (a) and micro/macro complications in type 2 diabetes mellitus: a forgotten target. **J. Geriatr. Cardiol.**, v. 12, n. 2, p. 93–99, 2015.
- WAHEED, S.; MALIK, F. P.; MAZHAR, S. B. Efficacy of metformin versus insulin in the management of pregnancy with diabetes. **J. Coll Physicians Surg. Pak.**, v. 23, n. 12, p. 866-869, 2013.
- WOOK, K.; JOSEPHINE, M. E. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. **Pharmacol. Rev.**, v. 60, n.4, p. 470-512, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. p. 88, 2016.
- ZANATTA, C. M. et al. Papel do sistema endotelina na nefropatia diabética. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 4, p. 581-588, 2008.

SEÇÃO 2

Avaliação histopatológica e morfométrica de rim de ratos Wistar diabéticos
tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina

RESUMO

A nefropatia diabética representa a principal complicação microvascular do diabetes, sendo a maior causa de insuficiência renal terminal do mundo. Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos dos tratamentos com metformina, melatonina e pentoxifilina sobre os parâmetros quantitativos e qualitativos do parênquima renal, bem como alterações na bioquímica sérica relacionada com a função renal de ratos Wistar adultos diabéticos. Para a realização do experimento foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade mantidos em condições de biotério no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram distribuídos em aleatoriamente em cinco grupos, alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos experimentalmente ao diabetes: (GD) grupo controle diabético; (GM) grupo tratado com metformina, (GMP) grupo tratado com metformina e pentoxifilina (100 mg/kg), (GMM) grupo tratado com metformina (500 mg/kg) e melatonina (5 mg/kg), (GMMP) grupo tratado com metformina, pentoxifilina e melatonina. Ao final do período experimental, os animais foram anestesiados e perfundidos, sendo coletados rins para análise qualitativa e quantitativa das lesões e soro sanguíneo para dosagem de ureia e creatinina. Com relação às lesões histopatológicas, as mais frequentes foram glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite proliferativa, glomerulonefrite membranoproliferativa, atrofia glomerular, hidropsia de tubo contorcido, tubo contorcido com debris celulares, necrose e congestão. A glicemia plasmática obtida, expressa em mg/dL, foi diferente estatisticamente entre grupo diabético sem tratamento ($419,1 \pm 28,1$) e o grupo tratado com metformina ($198,6 \pm 142,4$) e em relação ao grupo tratado com metformina e pentoxifilina. As concentrações séricas de ureia não apresentaram diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle. Porém, os valores médios dos animais tratados permaneceram acima dos padrões da normalidade para espécie. Os animais diabéticos submetidos ao tratamento com metformina + pentoxifilina e a associação destas com a melatonina proporcionaram uma tendência de redução dos valores dos níveis séricos de ureia em relação aos animais diabéticos sem tratamento. Com relação à albumina também não foi possível constatar diferença estatística entre os grupos. Os valores de creatinina nos grupos tratados com metformina+melatonina e a associação entre metformina+pentoxifilina+melanina tiveram redução estatisticamente significativa de 62% e 67%, respectivamente, em relação ao grupo diabético sem tratamento. A pentoxifilina potencializa a redução dos níveis glicêmicos decorrentes da administração de metformina. No entanto, não é capaz de reduzir as lesões glomerulares decorrentes do diabetes e a administração de dieta hiperlipídica. A metformina associada à melatonina ou em associação com pentoxifilina e melatonina, protege o parênquima renal de lesões histopatológicas e reduz os níveis séricos de creatinina de ratos diabéticos do tipo 2 submetidos a dieta hiperlipídica.

Palavras chave: Glomerulonefrite. Hiperglicemia. Hiperlipidemia. Diabetes.

ABSTRACT

Diabetic nephropathy represents the main microvascular complication of diabetes, being the largest cause of end-stage renal failure in the world. The objective of this study was to evaluate the effects of metformin, melatonin and pentoxiline on the quantitative and qualitative parameters of the renal parenchyma, as well as alterations in serum biochemistry related to the renal function of diabetic adult Wistar rats. For the experiments were performed 25 male Wistar rats, with 30 days old were kept under animal conditions in the Department of Morphology and Animal Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco. These animals were randomly distributed into five groups, fed a hyperlipid diet and experimentally induced to diabetes: (GD) diabetic control group; (GMM) group treated with metformin (GMP) group treated with metformin and pentoxifylline (100 mg/kg), (GMM) group treated with metformin (500 mg/kg) and melatonin (5 mg/kg) Treated with metformin, pentoxifylline and melatonin. At the end of the experimental period, the animals were anesthetized and perfused, and kidneys were collected for qualitative and quantitative analysis of the lesions and blood serum for the determination of urea and creatinine. With respect to the histopathological lesions, the most frequent were membranous glomerulonephritis, proliferative glomerulonephritis, membranoproliferative glomerulonephritis, glomerular atrophy, contorted tube hydropsy, tube contorted with cellular debris, necrosis and congestion. The plasma glucose obtained, expressed in mg/dL, was statistically different between the untreated diabetic group (419.1 ± 28.1) and the metformin group (198.6 ± 142.4) and in the group treated with Metformin and pentoxifylline. Serum urea concentrations were not statistically different between the treated groups and the control group. However, the mean values of the treated animals remained above normal for species. Diabetic animals submitted to treatment with metformin + pentoxifylline and their association with melatonin provided a tendency to reduce serum urea levels in relation to untreated diabetic animals. It was also not possible to establish a statistical difference between groups. The creatinine values in the groups treated with metformin + melatonin and the association between metformin + pentoxifylline + melanin had a statistically significant reduction of 62% and 67%, respectively, in relation to the untreated diabetic group. Pentoxifylline potentiates the reduction of glycemic levels resulting from the administration of metformin. However, it is not able to reduce the glomerular lesions due to diabetes and the administration of a hyperlipidic diet. Metformin associated with melatonin or in combination with pentoxifylline and melatonin protects the renal parenchyma from histopathological lesions and reduces serum creatinine levels in type 2 diabetic rats submitted to a hyperlipidemic diet.

Keywords: Glomerulonephritis. Hyperglycemia. Hyperlipidemia. Diabetes.

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crônica como consequência de uma deficiência na produção de insulina ou por uma diminuição da resposta dos tecidos a esta (SCHIFF et al., 2009; CHICCO; SPARAGNA, 2007; REES; ALCOLADO, 2005). A insulina tem um papel importante na utilização da glicose, dos lipídios e das proteínas como substrato energético. Desse modo, a deficiência de insulina provoca aumento do uso metabólico da gordura, aumenta as concentrações plasmáticas de colesterol e de fosfolipídios, e permite a depleção das proteínas e aumento dos aminoácidos plasmáticos. Ainda assim, a insulina aumenta a utilização da glicose pela maioria dos tecidos corporais, exceto o cérebro que utiliza a glicose sem o intermédio da insulina (GUYNTON e HALL, 2006).

No diabetes mellitus tipo 2, a obesidade é um dos fatores mais preponderantes no desenvolvimento da doença, sendo definida como um excesso de tecido adiposo que prejudica largamente a saúde e capacidade físicas, a interação e postura sociais e o bem estar individual (HELLMANN et al., 2011; AL-GOBLAN, AL-ALFI; KHAN, 2014). Atualmente é considerada um problema global que afeta tanto países desenvolvidos, como países em desenvolvimento e tem recebido, por parte de algumas nações, grande investimento, no sentido de controlar esta doença que afeta a mobilidade, a morbimortalidade (AL-GOBLAN, AL-ALFI; KHAN, 2014). Diabetes mellitus pode resultar em complicações crônicas macro e microvasculares, resultantes da ativação de mecanismos que aumentam a inflamação, o estresse oxidativo e apoptoses celulares, pela presença da hiperglicemia (BROWLEE, 2005).

A nefropatia diabética vem sendo a principal complicação microvascular do diabetes mellitus e a maior causa de insuficiência renal terminal do mundo (MOREIRA et al., 2008). O aumento na geração de espécies reativa de oxigênio (ERO) e a diminuição da atividade de enzimas antioxidantes resulta em estresse oxidativo nos rins de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (LING et al, 2013). A disfunção renal relacionada ao diabetes resulta da interação de diversos fatores: ambientais, metabólicos e hemodinâmicos que, atuando em conjunto, promovem o enfraquecimento da membrana glomerular, a expansão da matriz mesangial, a diminuição do número de podócitos, glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial (GIUNTI et al., 2006).

O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos dos tratamentos com metformina, melatonina e pentoxilina sobre os parâmetros quantitativos e qualitativos do parênquima renal, bem como alterações na bioquímica sérica relacionada com a função renal de ratos Wistar adultos diabéticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização dos experimentos foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem *Wistar*, livres de patógenos específicos, com idade de 30 dias, fornecidos e mantidos no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno coletivas, a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro), durante o período de aclimação durante 15 dias. Ao final do 15º dia, os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais (Quadro 1).

Quadro 1 - Disposição dos grupos experimentais por tratamento e sua duração, número de animais e vias de administração.

Grupos Experimentais	Número de Animais	Duração do Tratamento (dias)
GD: Controle diabético	5	30
GDM: Grupo diabético/ metformina (500 mg/kg/VO).	5	30
GDMP: Grupo diabético/ metformina (500 mg/kg/VO), pentoxifilina (100 mg/kg/VO).	5	30
GDMM: Grupo diabético/metformina (500 mg/kg), melatonina (5 mg/kg/VS)	5	30
GMMP: Grupo diabético/metformina (500 mg/kg), melatonina (5 mg/kg) , pentoxifilina(100mg/Kg/VO)	5	30

Durante o período experimental, os animais foram alimentados com a ração hiperlipídica (Tabela 1) e água de torneira foi fornecida *ad libitum*.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Protocolo nº 23082/20034/2016-29, sob Registro de

Licença nº 16/2017 - CEUA/UFRPE em conformidade com os princípios básicos para pesquisa com animais.

Tabela 1 - Lista de ingredientes utilizados para a preparação da dieta hiperlipídica.

Ingredientes	Quantidade (g)
Amido de milho	509,48
Caseína	200
Sacarose	100
Mix mineral	35
Mix vitamínico	10
Metionina	3
Colina	2,5
Óleo de soja	140

Fonte: FRANCO; CAMPOS; DEMONTE, 2009

2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram pesados semanalmente e anteriormente à eutanásia para a determinação do ganho de peso diário. As rações fornecidas e o desperdício foram pesados para a determinação do consumo de ração médio diário. A conversão alimentar foi obtida por meio da relação entre o consumo de ração e o ganho de peso no período.

A indução ao diabetes foi realizada através da administração de estreptozotocina (35 mg/kg) diluída em tampão citrato de sódio, por via intraperitoneal, após um jejum de 14 horas. A verificação da glicose sanguínea ocorreu após o jejum de 14 horas e o estabelecimento do diabetes foi confirmado entre sete e 14 dias após a indução, sendo incluídos no experimento apenas aqueles animais que possuíam glicemia acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active[®]). Após isso, a glicose sanguínea foi verificada (tiras reagentes Accu-Chek Active[®]) semanalmente em todos os grupos através da coleta de gotas de sangue da ponta da cauda dos animais.

2.3 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Ao final do período experimental os animais foram pesados, e anestesiados por injeção intraperitoneal de quetamina (25 mg/kg) associada à xilazina (10 mg/kg) na mesma seringa e aprofundamento anestésico com tiopental (100 mg/kg) (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). Posteriormente, foi realizada a coleta de sangue por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 mL de soro sanguíneo em tubos plásticos e mantidos à -20°C para posterior dosagem de ureia e creatinina. Após coleta de sangue foi feita perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA) e nitroprussiato (100mg/L; SIGMA[®]), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC[®], Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos.

Após a perfusão com solução fixadora os rins foram removidos e pesados. Seccionou-se os órgãos em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação em formalina tamponada a 10%. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram feitos, posteriormente corados em hematoxilina-eosina e tricrômico de Gomori segundo metodologia de (TOLOSA, 2003) e analisados morfológicamente e morfometricamente. A classificação das lesões foi feita através de cinco escores, de acordo com a variação da intensidade. O escore 0 foi atribuído a ausência de lesões, o escore 1 foi dado às lesões leves, o 2 às lesões de leves a moderadas, o 3 às moderadas, o 4 às moderadas a intensas e 5 às intensas.

2.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DOS GLOMÉRULOS

Para as análises morfométricas das áreas do glomérulo e da cápsula de Bowman foram realizadas 20 imagens por corte renal de cada animal dos diferentes grupos experimentais, obtidas através de uma câmera acoplada ao microscópio. O programa utilizado foi o software de análise de imagens Image J. As áreas do glomérulo e da cápsula de Bowman foram delimitadas manualmente através do contorno do glomérulo e da cápsula de Bowman. Através da diferença da área da cápsula de Bowman e do glomérulo,

obteve-se a área do espaço urinário. As imagens dos cortes histológicos foram processadas e armazenadas referindo sua magnificação final de aumento em escala de pixels proporcional às propriedades de cada campo histológico selecionado. A determinação do diâmetro glomerular foi realizada em 25 campos aleatórios por animal, através de duas medidas lineares, em dois eixos diferentes, de cada glomérulo (DANILEWICZ et al., 1998). Os resultados foram expressos em μm .

2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a determinação dos valores séricos dos marcadores de função renal, creatinina, ureia e albumina utilizaram-se Kits comerciais (Labtest ®, Minas Gerais, Brasil). Esta análise foi realizada no laboratório de histopatologia e imunohistoquímica do hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A concentração de ureia, creatinina e albumina expressa em mg/dl foram estimadas num aparelho em analisador semi-automático TP- Analyzer Basic ®.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão) e, quando necessárias, estas médias foram avaliadas mediante técnica de análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações com o intuito de analisar quais grupos diferiram entre si. Para dados que não seguiram as tendências de normalidade, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste post-hoc de Dunn. Para as construções gráficas, utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os valores do peso corporal e dos rins não tiveram diferenças significativas entre os grupos estudados. Alguns autores que utilizaram modelos experimentais similares, com

aumento de carga de lipídeos apenas, relataram maior depósito de tecido adiposo sem alteração no peso corporal (WOODS et al., 2003).

O padrão de distribuição da gordura corporal visceral está associado ao aumento de alterações metabólicas, hormonais, inflamatórias e hemodinâmicas, capazes de provocar maior acometimento sobre a microvasculatura e sobre os órgãos-alvo (SOWERS, 1998; SHI; CREGG, 2009; BROWN; CLEGG, 2010). Existem evidências que a obesidade também pode ser um fator de risco independente para o desenvolvimento de lesões renais, mesmo na ausência de doença hipertensiva ou diabética (KAMBHAM et al., 2001; FOX et al., 2004), e o seu efeito na iniciação e progressão da doença renal tem sido recentemente reconhecido (SAXENA; CHOPRA, 2004; DO CARMO et al., 2009).

Tabela 2 - Peso corporal (g) e renal (g) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental do e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	Peso corporal	Peso do Rim	Glicose*
GD	265,3 ± 49,7	1,617 ± 0,307	419,1 ± 28,1 ^a
GDM	306,3 ± 80,9	1,492 ± 0,169	198,6 ± 142,4 ^b
GDMP	285,8 ± 70,6	1,441 ± 0,229	170,0 ± 85,5 ^b
GDMM	272,5 ± 70,1	1,415 ± 0,222	268,5 ± 149,4 ^a
GDMMP	275,5 ± 39,8	1,426 ± 0,176	281,5 ± 99,4 ^a
p	0,826	0,537	0,009

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

* Valor de referência em ratos (138,72 ± 30,17) mg/dL (LIMA et al 2014).

4.1 ANÁLISE BIOQUÍMICA

A glicemia plasmática obtida, expressa em mg/dL, foi diferente estatisticamente entre grupo diabético sem tratamento (419,1 ± 28,1) e o grupo tratado com metformina (198,6 ± 142,4) e em relação ao grupo tratado com metformina e pentoxifilina (170,0 ± 85,5). Tal constatação ocorre devido a potencialização do efeito hipoglicemiante com o uso concomitante da pentoxifilina (SOTOS et al., 1987).

A lesão renal é uma complicação crônica microvascular muito frequente em pacientes diabéticos (BASTOS et al., 2010). Estudos clínicos demonstraram que a hiperglicemia é um importante fator para o desenvolvimento e progressão de doenças

renais em pacientes diabéticos (HAIDARA et al., 2009). Os níveis glicêmicos persistentemente elevados são danosos ao organismo e o descontrole prolongado resultaria em complicações, incluindo danos em diversos tecidos, perda da função normal e falência de vários órgãos (SUMITA; ANDRIOLO 2008),

As concentrações séricas de ureia não tiveram diferença estatística entre os grupos tratados e o grupo controle, porém, os valores médios dos animais tratados permaneceram acima dos padrões da normalidade para espécie (Tabela 3). Os animais diabéticos submetidos ao tratamento com metformina + pentoxifilina e a associação destas com melatonina não tiveram redução dos níveis séricos de ureia em relação aos animais diabéticos sem tratamento. A elevação da ureia sérica pode ser considerada um indicador para desidratação, perda peso, disfunção renal e hepática (CALIXTO-LIMA; REIS et al., 2012). O elevado nível de ureia verificado no diabetes tem origem na alteração do metabolismo de proteínas. Esta alteração manifesta-se por deficiência da síntese de proteínas, ativação da proteólise e redução na captação de aminoácidos pelos tecidos, efeitos esses causados pela falta de insulina. A maior concentração de aminoácidos no sangue leva a uma maior oferta de substratos para a neoglicogênese hepática, pelo aproveitamento da cadeia carbônica dos mesmos e o grupo amina no fígado dá origem a maior produção de ureia (TAYLOR et al., 1998).

Com relação à albumina também não foi possível constatar diferença estatística entre os grupos. Contudo, observou-se discreta tendência na elevação dos níveis séricos de albumina com o uso da metformina (GM) isoladamente ou em associação com a pentoxifilina (GMP) ou com as três associadas (GMMP). A albumina também é uma alternativa como marcador glicêmico de períodos curtos (duas a quatro semanas) (YOSHIUCHI, 2008) e, um importante marcador de lesão renal, seja uma lesão renal primária ou em consequências a doenças sistêmicas como hipertensão e diabetes. Os achados referentes aos níveis de albumina nos diferentes grupos experimentais indicam que pelo menos até o momento da eutanásia as lesões hepáticas e renais não foram determinantes para redução deste parâmetro sérico.

Os valores de creatinina nos grupos tratados com metformina+melatonina ($0,355 \pm 0,06$) e com metformina+pentoxifilina+melanina ($0,305 \pm 0,19$) tiveram redução estatisticamente significativa de 62% e 67%, respectivamente, em relação ao grupo diabético sem tratamento (Figura 1). A creatinina sérica é utilizada para a avaliação da

função renal, ou mais precisamente da taxa de filtração glomerular (KIRSZTAJN; NISHIDA, 2009). Podemos inferir que neste estudo, as propriedades antioxidantes da melatonina e pentoxifilina foram capazes de minimizar os danos na barreira de filtração causados aos rins em resposta à hiperglicemia prolongada. No diabetes a maior parte das lesões envolvidas com a perda da capacidade de filtração está relacionada ao espessamento da membranas basais vasculares e dos túbulos renais devido à acumulação de AGEs. Modelos experimentais em animais para o estudo da diabetes, exibiram níveis de deposição de AGEs superiores neste órgão, estando relacionados com alterações estruturais do rim reportados na nefropatia diabética, como é exemplo o espessamento da membrana glomerular, glomerulosclerose, expansão mesangial e fibrose túbulo-intersticial. A acumulação destes produtos não só avalia os níveis de hiperglicemia como também a hiperlipidemia, o stress oxidativo e inflamação (BARLOVIC et al., 2011; HEGAB et al., 2012; MEERWALDT et al., 2008).

Tabela 3 - Concentrações séricas de ureia, creatinina e albumina (mg/dL) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental do e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

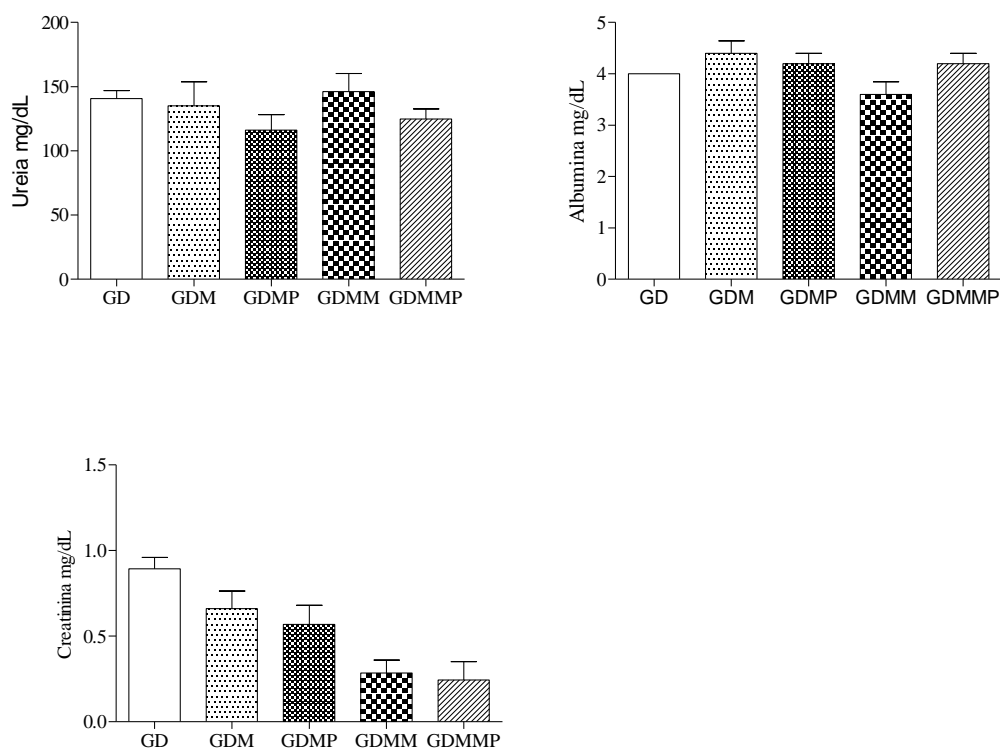
	Ureia*	Creatinina**	Albumina***
GD	140,7 ± 14,0	0,937 ± 0,19 ^a	3,9 ± 0,2
GDM	134,8 ± 42,5	0,670 ± 0,25 ^{ab}	4,4 ± 0,5
GDMP	116,1 ± 27,4	0,570 ± 0,25 ^{ab}	4,5 ± 0,6
GMMM	146,2 ± 31,8	0,355 ± 0,06 ^b	3,8 ± 0,4
GDMMP	124,8 ± 17,7	0,305 ± 0,19 ^b	4,2 ± 0,7
P	0,902	0,001	0,217

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística.

- Valores de referência para ureia*, (39,97 ± 6,78) mg/dL, creatinina** (0,58 ± 0,24) mg/dL e albumina*** (2,65 ± 0,30) mg/dL em ratos (LIMA et al 2014).

Figura 1 - Concentrações séricas de ureia, creatinina e albumina (mg/dL) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DOS GLOMÉRULOS

O glomérulo representa uma unidade de filtração altamente estruturada, composto de células endoteliais glomerulares, células mesangiais, podócitos e células epiteliais parietais (SCCELL et al., 2014). No diabetes, o controle dos níveis glicêmicos é fundamental para redução de lesões vasculares e de membrana basal de glomérulos evitando o espessamento desta e conseqüentemente redução da taxa de filtração glomerular (SALGADO et al., 2006).

Na comparação dos parâmetros morfométricos relacionados ao glomérulo não se observou diferença significativa entre os grupos (Tabela 4, Figura 2). Porém, no grupo diabético não tratado percebeu-se redução no diâmetro dos glomérulos, área da cápsula de Bowman, área do espaço subcapsular. Estes achados morfométricos corroboram a descrição histopatológica quanto à presença de glomerulonefrite membranoproliferativa e

atrofia glomerular. Estas lesões juntamente com o número de glomérulos afetados podem interferir na taxa de filtração glomerular (TFG). Este parâmetro é um importante indicativo na avaliação da função renal e também é utilizado no estadiamento da Doença Renal Crônica (DRC) (PECOITS-FILHO, 2004). O diabetes caracteriza-se como uma doença de caráter crônico que afeta progressiva e irreversivelmente a função renal, diminuindo a capacidade de filtração glomerular (BASTOS et al., 2010). Dentre as alterações mais comumente observadas na nefropatia diabética estão: espessamentos das membranas basal glomerular e basal tubular, a expansão mesangial, degeneração hialina das arteríolas e capilares glomerulares e a expansão fibrótica do interstício (AVANCINI et al., 2016).

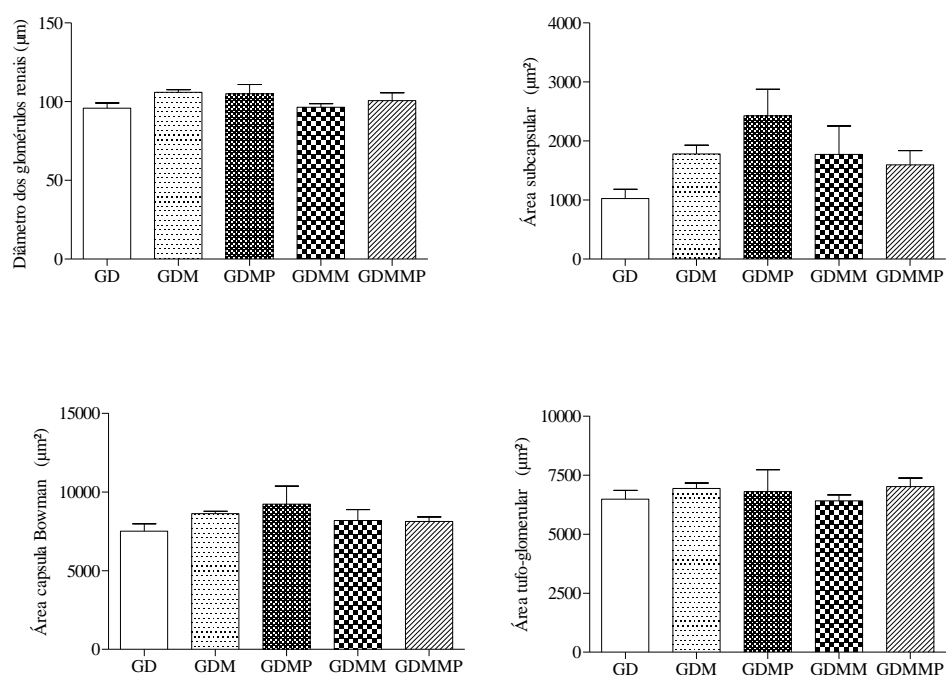
Tabela 4 – Medidas de diâmetro glomerular (μm), área capsular (μm^2), área subcapsular (μm^2) e área de tufo glomerular (μm^2) de rim de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	Diâmetro glomerular	Área capsular	Área subcapsular (Espaço de Bowman)	Área glomerular
GD	95,9 ± 7,1	7507,7 ± 1041,9	1029,9 ± 348,2	6477,9 ± 841,3
GDM	105,9 ± 3,8	8619,1 ± 345,2	1780,7 ± 327,4	6938,5 ± 499,6
GDP	105,1 ± 13,1	9234,1 ± 2536,2	2429,7 ± 1001,9	6806,2 ± 2059,2
GDMM	96,4 ± 5,0	8184,9 ± 1565,9	1771,1 ± 1082,1	6413,9 ± 560,4
GDMMP	100,6 ± 11,4	8112,8 ± 686,4	1593,7 ± 545,4	7012,8 ± 805,2
P	0,279	0,188	0,092	0,876

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão.

Figura 2 - Medidas de diâmetro glomerular (μm), área capsular (μm^2), área subcapsular (μm^2) e área de glomerular (μm^2) de rim de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



Fonte: Autor, 2017.

4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS RINS

Os rins são órgãos responsáveis pela excreção de resíduos metabólicos e controle da homeostase, que por sua vez, consiste em regular o volume extracelular, metabolismo do cálcio, balanço eletrolítico e controle do balanço ácido-básico. Lesões severas nestes órgãos promovem hipotensão e falência irreversíveis (MIDDENDORF e WILLIAMS, 2000).

No grupo diabético sem tratamento os glomérulos estavam atrofiados, havia a presença de glomerulonefrite membranoproliferativa, congestão glomerular e necrose dos túbulos renais (Tabelas 5, 6; Figuras 3A, 3B). Houve redução do espaço subcapsular interferindo no processo de filtração glomerular. A lesão glomerular severa prejudica o fluxo por meio do sistema vascular peritubular e também envia produtos potencialmente tóxicos para os túbulos; por outro lado, a destruição tubular, por aumentar a pressão intraglomerular, pode induzir à atrofia (BERNARDES; GÁSPARI, 2004).

Estudos mostraram que camundongos submetidos a dieta hiperlipídica apresentaram resistência à insulina associada a importantes alterações renais, como aumento da síntese e do acúmulo renal de triglicerídeos, expansão mesangial, lesão dos podócitos, acúmulo de matriz extracelular de proteínas glomerular e tubulointersticial (DEJI et al., 2009; JIANG et al., 2005).

No diabetes, as células mesangiais do glomérulo renal estão entre as células especialmente afetadas pela hiperglicemia. Isso se deve à incapacidade desses tipos celulares regular o transporte de glicose para o meio interno, ficando suscetíveis às altas concentrações de glicose durante os estados hiperglicêmicos. Essas altas concentrações intracelulares de glicose, por sua vez, estimularão as vias bioquímicas responsáveis pelas alterações fisiopatológicas do diabetes, quais sejam, via do polioliol, via da hexosamina, via dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) e via da proteína quinase C, entre as quais destaca-se a via de formação dos AGEs (BROWNLEE, 2001; BROWNLEE, 2005).

Tabela 5 - Frequência das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

Lesões encontradas	GD (n=5)	GDM (n=5)	GDMP (n=5)	GDMM (n=5)	GDMMP (n=5)	FA	FR (%)
Atrofia glomerular	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	24	96
Necrose tubular	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	25	100
Hidropsia tubular	4 (88%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	24	96
Congestão	5 (100%)	3 (60%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	23	92
Glomerulonefrite proliferativa	1 (20%)	-	-	-	-	1	4
Glomerulonefrite membranosa	1 (20%)	-	-	-	-	1	4
Glomerulonefrite membranoproliferativa	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	25	100

Notas – FA: Frequência absoluta, FR: Frequência relativa.

Tabela 6 - Intensidade das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

Lesões encontradas	GD (n=5)	GDM (n=5)	GDMP (n=5)	GDMM (n=5)	GDMMP (n=5)	P
Atrofia	1,4 ± 0,5 ^a	2,4 ± 1,1 ^{ab}	3,8 ± 1,3 ^b	3,0 ± 0,7 ^{ab}	1,8 ± 0,8 ^a	0,006
Necrose tubular	4,0 ± 0,0	3,6 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3 ± 0	3,2 ± 0,4	0,020
Congestão	3,2 ± 0,4	1 ± 1,2	1,4 ± 0,9	2,6 ± 1,3	2,8 ± 1,6	0,034
Glomerunefrite proliferativa	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,4 ± 0,5	-	0,700
Hidropsia em túbulos contorcidos	5,0 ± 0,0	4,0 ± 0,7	4,6 ± 0,5	5 ± 0	5 ± 0	0,002
Debris celulares em túbulos contorcidos	5,0 ± 0,0	4,4 ± 0,5	3,4 ± 0,9	4,4 ± 0,5	0,4 ± 0,2	0,005
Glomerulonefrite membranosa	0,9 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,001
Glomerulonefrite membranoproliferativa	5,0 ± 0,0	4,4 ± 0,8	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	0,100

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística.

Escores de lesões: 0 - ausência, 1 - leve, 2 - leve a moderada, 3 - moderada, 4 - moderada a intensa e 5 - intensa.

Nos animais tratados apenas com metformina constatou-se aumento de celularidade dos glomérulos com proliferação mesangial e intenso espessamento da matriz, redução do espaço de Bowman, necrose de túbulos coletores (Tabela 6; figuras 3C, 3D). A membrana basal glomerular, as células mesangiais, os podócitos e as células tubulares renais acumulam altos níveis de produtos finais de glicação avançada (AGEs). Este conjunto heterogêneo de moléculas tem em comum a capacidade de ativar receptores específicos (RAGE) aumentando a liberação do fator de crescimento β (TGF- β), que estimula a síntese de componentes da matriz do colágeno, fenômeno este que deve contribuir, ao menos parcialmente, para o espessamento da membrana basal, característico da nefropatia diabética (VLASSARA; PELACE, 2002). Recentemente foi demonstrado que a administração de metformina atenuou a nefropatia diabética e aterosclerose em ratos diabéticos por indução com estreptozotocina (ZHANG et al., 2009; ALHAIDER et al., 2011). No grupo tratado com metformina houve também vacuolização do epitélio cúbico simples. A formação de vacúolos dentro ou adjacente às células, frequentemente refere-se à área da zona da membrana basal de células basais, estando diretamente relacionada à degeneração hidrópica (figura 3C), que provocada por transtornos no equilíbrio hidroeletrólítico resulta em retenção de eletrólitos e água nas células (ISHIGAMI et al., 1997). O trânsito de eletrólitos por meio das membranas depende de mecanismos de transporte feito pelos canais iônicos, chamados bombas eletrólíticas como a Na^+/K^+

ATPase. Estudos confirmam que a diminuição da atividade da bomba de Na^+/K^+ ATPase leva a disfunção renal e a degeneração hidrópica causa compressão dos capilares renais diminuindo o suprimento sanguíneo do órgão (ISHIGAMI et al., 1997; BOGLIOLO, 1998). Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da função renal associados à dieta hiperlipídica, são complexos e não completamente entendidas.

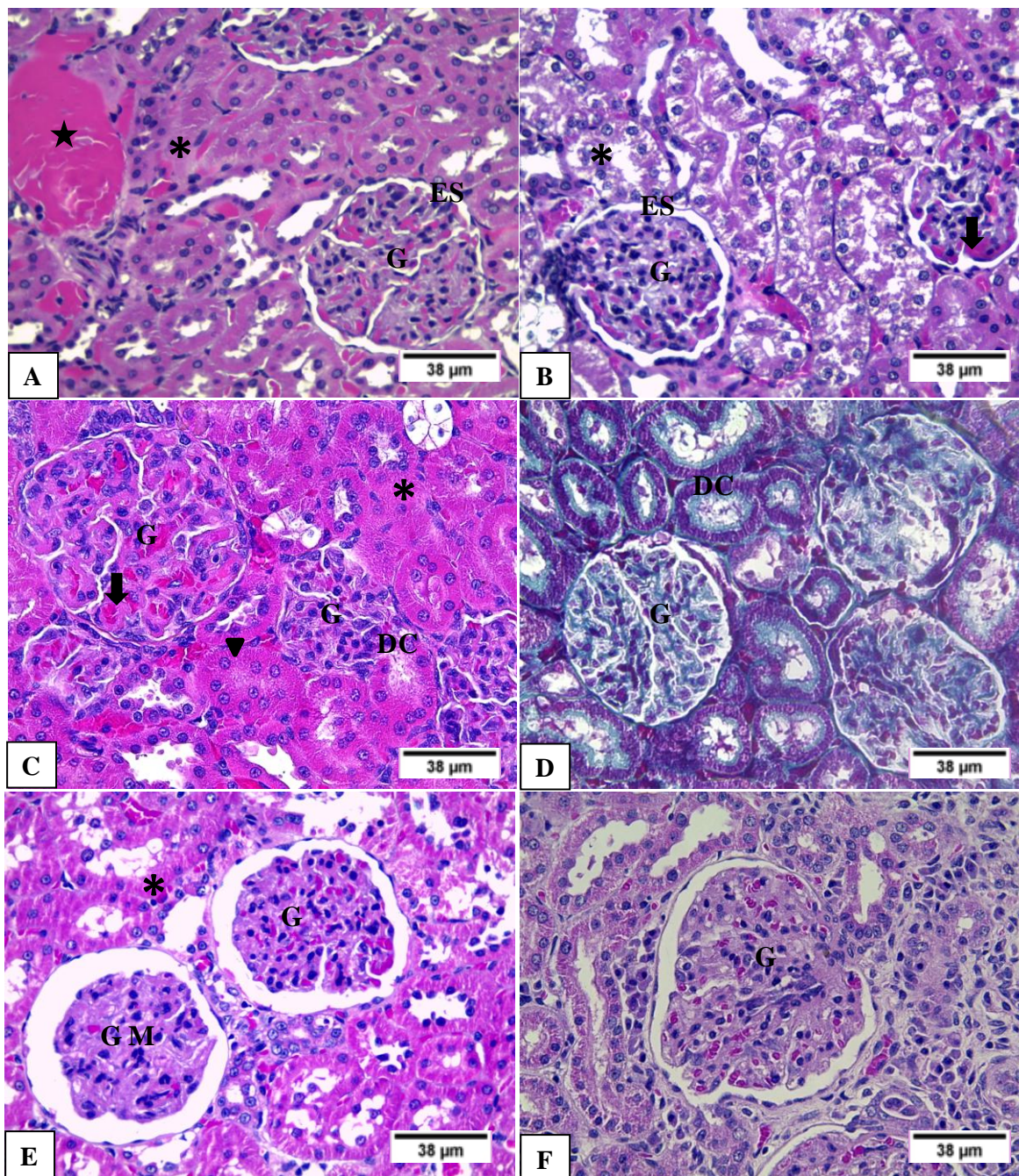
No grupo tratado com metformina e pentoxifilina foram constatadas hiperemia glomerular, diminuição do espaço capsular (Figura 3F). Nos túbulos contorcidos foram identificados degeneração celular, descamação celular com obstrução parcial do lúmen por debris celulares. Estudos com pentoxifilina (PTF) têm sugerido que a inibição do $\text{TNF-}\alpha$ pode ter um efeito benéfico no tratamento da nefropatia diabética. PTF é uma metilxantina inibidora da fosfodiesterase que possui propriedades anti-inflamatórias significativas. Além disso, o fármaco inibe a transcrição do gene de $\text{TNF-}\alpha$. Estudos experimentais demonstraram que a administração de PTF impede um aumento na expressão renal, síntese e excreção de $\text{TNF-}\alpha$ em ratos diabéticos com nefropatia, a qual foi diretamente associada com uma redução na retenção de sódio renal, hipertrofia renal e excreção urinária de albumina. Além destes resultados experimentais, os ensaios clínicos demonstraram que o PTF reduz significativamente os marcadores clínicos de lesões glomerulares e túbulo-intersticial em indivíduos diabéticos (DOBERTY et al., 1991).

Nos rins dos animais tratados com metformina e melatonina foram observadas glomerulonefrite proliferativa (figura 4A), glomerulonefrite membranosa, congestão corticomedular, degeneração hidrópica e necrose tubular em intensidade semelhante aos outros grupos, mesmo a melatonina possuindo propriedades antioxidantes que agem diretamente sobre radicais de oxigênio e nitrogênio, com evidências na redução da lesão oxidativa em rins e em outros órgãos (MAHIEU, et al., 2009, BELLÉS et al., 2007, EL-SOKKARY, ABDEL-RAHMAN, KAMEL, 2005).

Nos animais tratados com metformina, melatonina e pentoxifilina observou-se congestão renal corticomedular difusa e discreta, atrofia de glomérulo, glomerulonefrite membranoproliferativa (Tabela 6, Figuras 4C, 4D), degeneração hidrópica de túbulos contorcidos proximal e distal, necrose de túbulos contorcidos, presença de albumina no lume de alguns túbulos renais. É a hiperglicemia crônica, acompanhada de distúrbios hemodinâmicos, são os responsáveis pelas alterações funcionais e estruturais dos vasos e capilares glomerulares que resultam em perdas urinárias de proteínas e a aterogênese

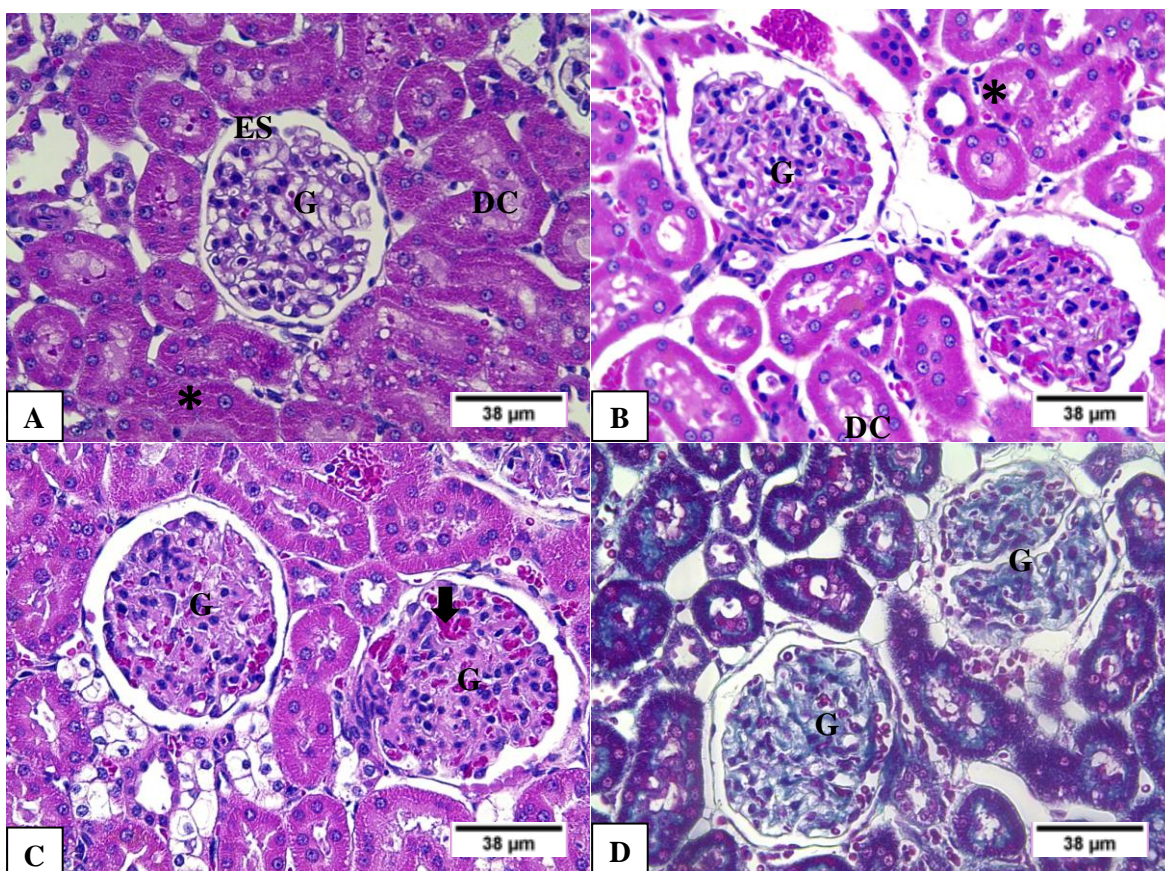
acelerada da macrovasculatura (AGUIAR, 2007; TESAURO, 2009). No entanto, os animais diabéticos tratados com a associação MMP tiveram presença de glomerulonefrite membranosa e de debris celulares nos túbulos contorcidos em menor intensidade em relação aos demais grupos, além de ausência de glomerulonefrite proliferativa.

Figura 3 - Fotomicrografia do parênquima renal de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



Notas: **A:** corpúsculos renais do grupo controle com presença de glomerulonefrite membranosa (G). Notar congestão (estrela); espaço subcapsular diminuído (ES). Túbulo renal necrosado (*). HE. **B:** Corpúsculos renais do grupo controle com presença de glomerulonefrite membranoproliferativa (G). Notar hiperemia glomerular (seta); espaço subcapsular diminuído (ES). HE. **C:** - corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina com glomerulonefrite membranoproliferativa (G). Notar hiperemia glomerular (seta); espaço subcapsular diminuído (ES). Túbulo renal necrosado (*); túbulo parcialmente obstruído por fragmentos citoplasmáticos (DC). Túbulo renal com degeneração hidrópica (cabeça de seta). HE. **D:** corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina com presença de glomerulonefrite membranoproliferativa (G). Notar espaço subcapsular diminuído (ES). Túbulo renal com debris celulares (DC). Tricrômico de Gomori. **E:** corpúsculos renais do grupo diabético tratado com metformina e pentoxifilina com presença de glomerulonefrite membranosa membranoproliferativa (G) e glomerulonefrite membranosa (GM). Túbulo renal em necrose (*). HE. **F:** corpúsculos renais do grupo diabético tratado com metformina e pentoxifilina com presença de glomerulonefrite membranoproliferativa (G). HE.

Figura 4 - Fotomicrografia do parênquima renal de ratos Wistar de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



Notas: **A:** corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina e melatonina. Notar espaço subcapsular diminuído (ES). Túbulo renal necrosado (*); túbulo obstruído por fragmentos citoplasmáticos (DC). HE. **B:** corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina e melatonina com glomerulonefrite membranoproliferativa (G); Notar Túbulo renal necrosado (*); túbulo parcialmente obstruído por fragmentos citoplasmáticos (DC). HE. **C:** corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina, melatonina e pentoxifilina com glomerulonefrite membranoproliferativa (G); Notar hiperemia glomerular (Seta). HE. **D:** corpúsculo renal do grupo diabético tratado com metformina, melatonina e pentoxifilina com glomerulonefrite membranoproliferativa (G). Tricrômico de Gomori.

5 CONCLUSÃO

A pentoxifilina potencializa a redução dos níveis glicêmicos decorrentes da administração de metformina. No entanto, não é capaz de reduzir as lesões glomerulares decorrentes do diabetes e a administração de dieta hiperlipídica. A metformina associada à melatonina ou em associação com pentoxifilina e melatonina, minimiza as lesões glomerulares e tubulares no parênquima renal, além de reduzir os níveis séricos de creatinina de ratos diabéticos submetidos a dieta hiperlipídica. Contudo o tratamento MMP oferece maior proteção às estruturas e a função renal de ratos com diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.G. de. A microcirculação no diabetes: implicações nas complicações crônicas e tratamento da doença. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 51, n. 2, mar. 2007.

ALI-GOBLAN, A. S.; ALI-ALFI, M. A; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes Metabol. Syndr. Obes.**, v.7, p. 587–591, 2014.

AVANCINI CARAMORI, M. L.; ROSSING, P. Chapter 54 - Diabetic Nephropathy A2 - Jameson, J. Larry, in **Endocrinology: Adult and Pediatric** (Seventh Edition), L.J.D. Groot, et al., Editors. W.B. Saunders: Philadelphia. p. 934-957.2016.

BARLOVIC, D. P.; SORO-PAAVONEN, A.; JANDELEIT-DAHM, K. A. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. **Clin. Sci.**, v.121, n.2, p.43-55. 2011.

BASTOS, M. G.; BREGMAN. R.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Rev. Ass. Med. Bras.**, v. 56, n. 2, 2010.

BELLÉS, M.; LINARES, V.; ALBINA, M. L. et al. Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats. **J. Pineal Res.**, v.43, p.87-95. 2007.

BERNARDES, C. F.; GÁSPARI, P. E. **Bioquímica experimental**. Campinas: Unicamp, 2004.

BOGLIOLO, G.B.F. **Patologia geral**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 186-95, 1998.

BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. Central effects of estradiol in the regulation of food intake, body weight, and adiposity. **J. Steroid Biochem.**, v. 122, p. 65-73, 2010.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, p. 813-820, 2001.

BROWNLEE, M. The pathology of diabetic complications: a unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p.1615-1625, 2005.

CALIXTO-LIMA, L; REIS, N.T. Interpretação de exames laboratoriais aplicados à nutrição clínica. Rubio: Rio de Janeiro. 2012.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.14, p. 274-281, 2003.

CHICCO, A. J., SPARAGNA, G. C., Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 292, n. 1, p. 33-44, 2007.

COOPER, M.E. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. **Lancet**, v.352, p. 213-219, 1998.

DANILEWICZ, M.; WAGROWSKA-DANILEWICZ, M. Diffuse idiopathic mesangial proliferative glomerulonephritis in re-biopsied patients. A quantitative study. **Clin. Investigation**, v. 4, n. 6, p. 955-959., 1998.

DEJI, N. et al. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. **Am. J. Physiol Renal**, v. 296, n.1, p. 118-126, 2009.

DO CARMO, J. M. et al. Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptor deficient mice. **Am. J. Physiol. Reg. I.**, v. 297, p. 803–812, 2009.

DOBERTY, G.M. et al. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. **Surgery**, v. 110, n. 2, p.192-198, 1991.

DZAU, V. J.; INGELFINGER, J. R.; PRATT, R. E. Regulation of tissue renin and angiotensin gene expressions. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v.10, n. 11, p.11-16, 1986.

EL-SOKKARY G. H.; ABDEL-RAHMAN, G.H.; KAMEL, E. S. Melatonin protects against lead induced hepatic and renal toxicity in male rats. **Toxicology**, v.213, p. 25-33. 2005.

FERRARIO, C. M. Importance of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAS) in the physiology and pathology of hypertension. An overview. **Drugs**, v. 39, n. 2, p.1-8, 1990.

FIERRO, J. A. C. Nefropatía diabética: fisiopatología, diagnóstico, evolución clínica y epidemiología. **Rev. Med. Clin.**, Condes, v. 20, p. 639-50, 2009.

FOX, C. S. et al. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. **J. Am. Med. Assoc.** v. 291, p. 844-850, 2004.

FRANCO, L. D. P.; CAMPOS, J. A. D. B.; DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Rev. Nutr.**, v. 22, N. 3, p. 359-366, 2009.

GIUNT, S. et al. Mechanisms of diabetic nephropathy. role of hypertension. **Hypertension published online**, v. 48, p. 519-526, 2006.

GUYNTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

H Aidara, M.A.; et al. Evaluation of the effect of oxidative stress and vitamin E supplementation on renal function in rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **J. Diabet. Complications**, v. 23, p.130-136, 2009.

HEGAB, Z et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease. **World J. Cardiol.**, v. 4, n.4, p. 90-102, 2012.

HELLMANN, et al. Resolvin D1 decreases adipose tissue macrophage accumulation and improves insulin sensitivity in obese-diabetic mice. **The FASEB Journal**, v. 25, n.7, p. 2399-2407, 2011.

HERAS, M.M., JEREZ, M.M, Coronel F. Nefropatía diabética: fisiopatología y curso clínico. **Nefrol.**, v. 21, p. 24-31, 2001.

INAGAMI, T.; GUO, D. F.; KITAMI, Y. Molecular biology of angiotensin II receptors: an overview. **J. Hypertens**, v.12, p.83-94, 1994.

ISHIGAMI, M. et al. Renal effects of alcohol withdrawal in five-week alcohol-treated rats. **J. Stud. Alcohol.**, v. 58, n. 4, p. 392-6. 1997.

ISHIGAMI, M. et al. Renal effects of alcohol withdrawal in five-week alcohol-treated rats. **J. Stud. Alcohol.**, v.58, n. 4, p.392-396,1997.

JIANG, T. et al. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 37, p.32317-32325.

KAMBHAM, N. et al. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. **Kidney Int.**, v.59, p.1498-1509, 2001.

KIRSZTAJN, M. G.; NISHIDA, S.K. Avaliação de função renal. In: KIRSZTAJN, M.

KLOET, A. D.; KRAUSE, E. G.; WOODS, S. C. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. **Physiol. Behav.** v.100, n. 5, p. 525-534, 2010.

KRIKKEN, J. A.; BAKKER, S. J. L.; NAVIS, G. J. Editorial Comment: Role of renal haemodynamics in the renal risks of overweight. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 24, p. 1708–1711, 2009.

LEE, T. S., et al. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v. 86, p. 5141-5145, 1989.

LEE, Y. H. et al. Davallialactone reduces inflammation and repairs dentinogenesis on glucose oxidase-induced stress in dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 39, p.1401-1406, 2013.

LING, C. et al. Ursolic Acid provides kidney protection in diabetic rats. **Curr. Ther Res. Clin. Exp.**, v.75, p.59-63, 2013.

MAHIEU, S. et al. Melatonin reduces oxidative damage induced by aluminium in rat kidney. **Toxicol. Letters**, v.190, p.9-15. 2009.

MEERWALDT, R. et al. The clinical relevance of assessing advanced glycation end products accumulation in diabetes. **Cardiovasc. Diabetol.**, v.7, n. 29, p.1-8, 2008.

MENARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **J. Hypertens. Suppl.**, v.11, p. 3-11, 1993.

MIDDENDORF, P.J.; WILLIAMS, P.L. Nephrotoxicity: Toxic Responses of the Kidney. In: WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology:**

environmental 134 and industrial applications. A Wiley-Interscience Publication, Second Edition. New York, cap. 5, p. 120- 25, 2000.

MOREIRA, H. G. et al. 2008. Diabetes mellitus, hipertensão arterial e doença renal crônica: estratégias terapêuticas e suas limitações. **Ver. Bras. Hipertens.** v.15, n. 2, p. 111-116, 2008.

PECOITS-FILHO, R. Diretrizes brasileiras de doença renal crônica: avaliação da função renal. **J. Bras. Nefrol.**, v. 26, n.3, p. 4-5, 2004.

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

SAXENA, K. A.; CHOPRA, R. Renal risks of an emerging epidemic of obesity: the role of adipocyte-derived factors. **Dialysis Transplant**, v. 33, n. 1, p. 11-20, 2004.

SBD (Sociedade Brasileira de Diabetes). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2009. Itapeví, Brasil: A. Araújo Silva Farmacéutica, 2009.

SCHELL, C.; WANNER, N.; HUBER, T. B. Glomerular development-shaping the multi-cellular filtration unit. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2014.

SCHIFF, M., et al. Mitochondria and diabetes mellitus: untangling a conflictive relationship? **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 32, n. 6, p. 684-98, 2009.

SHIH, W.; HINES W. H.; NEILSON, E. G. Effects of cyclosporin A on the development of immune-mediated interstitial nephritis. **Kidney Int.**, v. 33, p. 1113-1118, 1988.

SMELTZER, S.C., Bare BG. Histórico e tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus. In: SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. Tratado de enfermagem médico-cirúrgico. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 34-43, 2002.

SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clinical Chemistry.** v. 44, n.8, p.1821-1825, 1998.

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

TAYLOR, G.W. et al. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. **J. Periodontol.**, v.69, n.1, p.76-83,1998.

TESAURO, M. Danno endoteliale e malattia diabética: possibile ruolo nella nefropatia. **Giornale Italiano Di Nefrologia**, Roma, p. 62-70, 2009.

TOLOSA, E.M.C, et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica.** 2ed. Barueri SP: Manole,2003.241p.

VLASSARA, H. et al. Inflammatory mediators are induced by dietary glycotoxins, a major risk factor for diabetic angiopathy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, n. 24, p. 15596-15601, 2002.

WENDT, T. M., et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Am. J. Pathol.**, v. 162, p. 1123-1137, 2003.

WOODS, S. C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J. Nutr.**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, 2003.

YOSHIUCHI, K. T et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobina in type 1 and type 2 diabetes. **Endocr. J.**, v. 55, p. 503-507, 2008.

SEÇÃO 3

Avaliação histopatológica e morfométrica de fígado de ratos Wistar diabético tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina

RESUMO

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma importante complicação da obesidade, sua prevalência varia de 2,8% a 88 %, dependendo da população estudada e dos métodos de investigação. Os principais fatores de risco associados à síndrome metabólica são obesidade abdominal, resistência à insulina, diabetes e dislipidemia. O estudo teve como objetivo avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas hepáticas pela determinação da densidade volumétrica dos componentes hepáticos (hepatócitos mononucleados, binucleados, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e células de Kupffer), e avaliação da integridade hepática pela dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) e análise histopatológica e do tecido hepático de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, melatonina e pentoxifilina. Para a realização dos experimentos foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem *Wistar*, com 30 dias de idade mantidos em condições de biotério no Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Esses animais foram divididos em cinco grupos experimentais: distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de animais e, alimentados com dieta hiperlipídica e induzidos experimentalmente ao diabetes: (GD) grupo controle diabético; (GM) grupo tratado com metformina, (GMP) tratado com metformina e pentoxifilina (100 mg/kg), (GMM) tratados com metformina (500 mg/kg) e melatonina (5 mg/kg), (GMMP) tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina. Ao final do período experimental animais foram anestesiados e perfundidos, sendo coletados fígados para análise histopatológica e histomorfométrica. Com relação às lesões histopatológicas, as mais frequentes foram microesteatose, macroesteatose, hipertrofia de hepatócitos, estreitamento de capilares sinusoides, necrose de coagulação, congestão de veia centro-lobular, congestão do parênquima hepático, atrofia de cordões de hepatócitos e dilatação de capilares sinusoides. Quanto à densidade volumétrica (%) não houve diferença no percentual de hepatócitos necrótico, hepatócitos mononucleados, hepatócitos binucleado, vasos, células de Kupffer e ductos biliares. Com relação ao percentual de capilares sinusoides, o grupo tratado com metformina associada à melatonina teve aumento em relação aos demais grupos. A utilização da metformina associada à pentoxifilina reduziu significativamente os níveis glicêmicos, porém não foi suficiente para minimizar os danos hepáticos. A associação de metformina com a melatonina e pentoxifilina influenciou na redução dos níveis séricos de ALT e nos danos compatíveis com a doença hepática gordurosa não alcoólica em animais diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica.

Palavras chave: Microesteatose. Macroesteatose. Metformina. Melatonina. Pentoxifilina.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is an important complication of obesity, its prevalence varies from 2.8% to 88%, depending on the population studied and research methods. The main risk factors associated with the metabolic syndrome are abdominal obesity, insulin resistance, diabetes and dyslipidemia. The aim of the study was to evaluate the histopathological and morphometric changes in the liver by determining the volumetric density of hepatic components (mononuclear hepatocytes, binucleate, sinusoidal capillaries, blood vessels and Kupffer cells), and evaluation of hepatic integrity by dosing aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyltransferase (GGT) and alkaline phosphatase (ALP), and histopathological and liver tissue analysis of adult Wistar rats induced by experimental diabetes undergoing a hyperlipidic diet and treated with metformin, melatonin and pentoxifylline. To perform the experiment, 25 male Wistar rats with 30 days old were kept under animal conditions in the Department of Morphology and Animal Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco. five groups of animals and fed a hyperlipid diet and experimentally induced to diabetes: (GD) diabetic control group; (GMM) treated with metformin (GMG) treated with metformin (GMP) treated with metformin (500 mg/kg) and melatonin (5 mg/kg), metformin treated with metformin and pentoxifylline, Pentoxifylline and melatonin. At the end of the experimental period animals were anesthetized and perfused, and livers were collected for histopathological and histomorphometric analysis. The most frequent histopathological lesions were microsteatosis, macrosteatosis, hepatocyte hypertrophy, narrowing of sinusoidal capillaries, coagulation necrosis, central lobular vein congestion, hepatic parenchyma congestion, hepatocyte cord atrophy and dilation of sinusoidal capillaries. As to volume density (%) there was no difference in the percentage of necrotic hepatocytes, mononucleated hepatocytes, binucleated hepatocytes, vessels, Kupffer cells and bile ducts. Regarding the percentage of sinusoidal capillaries, the group treated with metformin associated with melatonin had an increase in relation to the other groups. The use of metformin associated with pentoxifylline significantly reduced glycemic levels, but was not sufficient to minimize liver damage. The association of metformin with melatonin and pentoxifylline has influenced the reduction of serum ALT levels and damage compatible with non-alcoholic fatty liver disease in diabetic animals submitted to the hyperlipid diet.

Keywords: Microsteatosis. Macrosteatosis. Metformin. Melatonin. Pentoxifylline.

1 INTRODUÇÃO

A degeneração gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DHGNA) termo utilizado para designar um amplo espectro de desordens hepáticas, que vai desde a esteatose até a cirrose está relacionada, principalmente, ao diabetes mellitus e a obesidade (FARRELL e LATER, 2006; SMITH e ADAMS, 2011; SILVA; ESCANHOELA, 2009; AHMADIEH e AZAR, 2014).

A doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é uma doença espectral e está subdividida em dois grupos principais, de acordo com seus aspectos clínico-morfológicos básicos: esteatose hepática ou simplesmente fígado gorduroso e a esteato-hepatite não alcoólica (EHNA). O primeiro estado caracteriza-se pelo acúmulo lipídico nos hepatócitos. Essa gordura heterotópica desencadeia graus variáveis de fenômenos necroinflamatórios, o que corresponde à esteato-hepatite, condição associada à doença progressiva (BRUNT, 2010).

O fígado é o principal alvo da insulina. Ele exerce um papel de extrema importância na glicemia, sendo responsável pela manutenção da glicose e, respondendo a ação dos hormônios insulina e do glucagon (NELSON e COX, 2011).

O mecanismo de resistência à ação da insulina causa inibição da lipase lipoproteica insulino-sensível no tecido adiposo. Há aumento do influxo de ácidos graxos para a circulação sanguínea e daí para o fígado. Em decorrência da hiperinsulinemia compensatória, a β -oxidação e a liberação de triglicerídeos na forma de VLDL estão inibidas no fígado. Os ácidos graxos em excesso são convertidos em triglicerídeos que se acumulam no fígado, levando ao quadro de esteatose hepática.

Estudos recentes vêm mostrando que o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é um fator de risco agravante para a fibrose hepática, independentemente de outros fatores relacionados à DHGNA (ORTIZ-LOPEZ, 2012). A doença hepática em pacientes com DHGNA e DM2 é mais intensa e, há um risco maior de evoluir para cirrose e aumentar a taxa de mortalidade (BOSQUES-PADILLA et al., 2008).

Objetivou-se com este estudo avaliar as alterações histopatológicas e morfométricas hepáticas pela determinação da densidade volumétrica dos componentes hepáticos (hepatócitos mononucleados, binucleados, capilares sinusoides, vasos sanguíneos e células de Kupffer), e avaliação da integridade hepática pela dosagem das enzimas aspartato

aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) e análise histopatológica e do tecido hepático de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, melatonina e pentoxilina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para a realização dos experimentos foram utilizados 25 ratos machos, da linhagem *Wistar*, livres de patógenos específicos, com idade de 30 dias, fornecidos e mantidos no Biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE. Os animais foram alocados em gaiolas de polipropileno coletivas, a temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo das 07:00 as 19:00 horas (período claro) e 19:00 as 07:00 horas (período escuro), durante o período de aclimação durante 15 dias.

Ao final do décimo quinto dia, os animais foram aleatoriamente distribuídos em 5 grupos experimentais (Quadro 1).

Quadro 1. Disposição dos grupos experimentais por tratamento e sua duração, número de animais e vias de administração.

Grupos Experimentais	Número de Animais	Duração do Tratamento (dias)
GD: Controle diabético (n=5)	5	30
GDM: Grupo diabético/ metformina (500 mg/kg/VO).	5	30
GDMP: Grupo diabético/ metformina (500 mg/kg/VO), pentoxifilina (100 mg/kg/VO).	5	30
GDMM: Grupo diabético/metformina (500 mg/kg), melatonina (5 mg/kg/VS)	5	30
GMMP: Grupo diabético/metformina (500 mg/kg), melatonina(5 mg/kg) , pentoxifilina(100mg/Kg/VO)	5	30

Durante o período experimental, os animais foram alimentados com a ração hiperlipídica (Tabela 1), água de torneira foi fornecida *ad libitum*.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Protocolo nº 23082/20034/2016-29, sob Registro de Licença nº 16/2017 - CEUA/UFRPE em conformidade com os princípios básicos para pesquisa com animais.

Tabela 1 - Lista de ingredientes utilizados para a preparação da dieta hiperlipídica.

Ingredientes	Quantidade (g)
Amido de milho	509,48
Caseína	200
Sacarose	100
Mix mineral	35
Mix vitamínico	10
Metionina	3
Colina	2,5
Óleo de soja	140

Fonte: FRANCO; CAMPOS; DEMONTE, 2009

2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram pesados semanalmente e anteriormente à eutanásia para a determinação do ganho de peso diário. A ração fornecida e o desperdício foram pesados para a determinação do consumo de ração médio diário. A conversão alimentar foi obtida por meio da relação entre o consumo de ração e o ganho de peso no período.

A indução ao diabetes foi realizada através da administração de estreptozotocina (35 mg/kg) diluída em tampão citrato de sódio, por via intraperitoneal, após um jejum de 14 horas. A verificação da glicose sanguínea ocorreu após o jejum de 14 horas e o estabelecimento do diabetes foi confirmado entre 7 e 14 dias após a indução, foram incluídos no experimento apenas aqueles animais que possuíam glicemia acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Active). Após isso, a glicose sanguínea foi verificada

(tiras reagentes Accu-Chek Active) semanalmente em todos os grupos através da coleta de gotas de sangue da ponta da cauda dos animais.

2.3 PERFUSÃO TECIDUAL E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Ao final do período experimental os animais foram pesados e, anestesiados por injeção intraperitoneal de quetamina (25 mg/kg) associada à xilazina (10 mg/kg) na mesma seringa e aprofundamento anestésico com tiopental (100 mg/kg) (FANTONI; CORTOPASSI, 1994). Posteriormente foi realizada a coleta de sangue por punção no seio venoso (confluência das veias cavas), centrifugação e acondicionamento de duas alíquotas de 1 mL de soro sanguíneo em eppendorfs e mantidos à -20°C para posterior dosagem de AST, ALT, GGT, ALP. Após a coleta de sangue foi feita perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de heparina sódica (500 UI/L; AKZO ORGANON TEKNIKA) e nitroprussiato (100mg/L; SIGMA[®]), por um período de tempo entre 5 e 10 minutos. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fixadora de glutaraldeído (VETEC[®], Brasil) a 4%, em tampão fosfato de sódio, pH 7,2 e 0,01M, durante 25 minutos.

Após a perfusão com solução fixadora o fígado foi removido e pesado. Seccionaram-se os órgãos em fragmentos de até 2 mm de espessura, os quais foram submetidos à refixação em formalina tamponada a 10%. Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4 µm de espessura foram feitos, posteriormente corados em hematoxilina-eosina e PAS e analisados morfológicamente e morfometricamente. A classificação das lesões foi feita através de cinco escores, de acordo com a variação da intensidade. O escore 0 foi atribuído a ausência de lesões, o escore 1 foi dado às lesões leves, o 2 às lesões de leves a moderadas, o 3 às moderadas, o 4 às moderadas a intensas e 5 às intensas.

2.4 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO FÍGADO

A densidade volumétrica relativa (%) dos componentes hepáticos (hepatócitos necróticos anucleados, mononucleados, binucleados, capilares sinusoides, vasos

sanguíneos e células de Kupffer) foi determinada utilizando uma grade com 400 pontos intersecções observando-se dez campos por animal no aumento de 40X, totalizando quatro mil pontos por animal.

2.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Determinação da atividade da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gamaglutamiltransferase (GGT) plasmática e atividade das transaminases foi determinada no soro, utilizando-se kit comercial (Labtest ®, Minas Gerais, Brasil) em analisador automático Labmax 240 da Labtest ® (Minas Gerais, Brasil).

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram expressos através da estatística descritiva de tendência de centralidade e dispersão (média e desvio padrão) e, quando necessárias, estas médias foram avaliadas mediante técnica de análise de variância (ANOVA), com post-hoc de Tukey-Kramer como teste de múltiplas comparações com o intuito de analisar quais grupos diferiram entre si. Para dados que não seguiram as tendências de normalidade, realizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste post-hoc de Dunn. Para as construções gráficas, utilizou-se o programa GraphPad Prism (versão 5.0). O tratamento estatístico foi delineado com nível de significância para $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

Com relação às enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT), não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. No entanto, a concentração sérica dessas enzimas estava acima dos níveis considerados normais (Tabela 2). A administração de dieta hipercalórica pode ocasionar lesões histopatológicas, tais como esteatose,

esteatohepatite, fibrose e cirrose, que são responsáveis pela elevação destas enzimas e alterações na função hepática (CHAVES et al., 2012). AST e ALT são enzimas intracelulares presentes nos hepatócitos e de escolha para o auxílio de diagnóstico (MOTTA, 2009). Essas enzimas catalisam a conversão de aspartato e alanina em oxilacetato e piruvato, respectivamente e são parâmetros úteis na avaliação das lesões.

Observou-se também que mesmo estando acima do nível de concentração normal, houve uma tendência a diminuição dos níveis plasmáticos de ALT no grupo submetido ao tratamento com a metformina associada à melatonina e pentoxifilina em relação aos demais grupos (Tabela 2). A comparação da metformina com a pioglitazona no tratamento da esteatose hepática constatou que a metformina é capaz de reduzir os níveis de alanina aminotransferase (ALT), mas não de melhorar a deposição de gordura no fígado (GUPTA et al. 2010). No presente experimento, esta tendência de redução pode estar relacionada devido à administração da pentoxifilina e melatonina. Segundo Moraes (2014), o tratamento com melatonina foi capaz de reduzir as concentrações séricas de ALT e GGT, desempenhando um papel protetor no fígado desses animais. A melatonina atua como um potente antioxidante, interagindo e neutralizando ERO através de transferência de elétrons e aumentando expressão gênica de enzimas antioxidantes como glicose 6-fosfato desidrogenase, superóxido desmutase, catalase, glutathione peroxidase e glutadiona redutase (HARDELAND, 2011). A pentoxifilina, por sua vez, promove a diminuição na produção de TNF- α e interleucinas 1 e 6 (citocina pró-fibróticas) e conseqüentemente dano hepático (MARTINO et al., 2010).

Os níveis séricos de GGT não tiveram diferença significativa e estavam diminuídos. No que diz respeito às concentrações séricas de fosfatase alcalina (ALP) não houve diferença estatística, apesar de estarem elevadas em todos os grupos, principalmente nos animais diabéticos sem tratamento (Tabela 2), sendo condizente com os achados da literatura em que no diabetes a atividade de ALP sérica é elevada no estágio inicial da doença (KOYAMA ET AL., 1998). A fosfatase alcalina (ALP) está presente em vários tecidos, principalmente ósseo, no sistema hepatobiliar e na mucosa gastrointestinal e é indicadora da ocorrência de colestase (SANTOS et al., 2008). Elevações em sua concentração sérica também podem ser consideradas indicadores de Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (HANLEY et AL., 2005).

Tabela 2 - Concentrações séricas de ALT, AST, GGT e ALP (U/L) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	ALT*	AST**	GGT***	ALP****
GD	78,79 ± 29,53	172,49 ± 85,51	0,61 ± 1,37	1436,31 ± 705,31
GDM	92,47 ± 75,24	267,69 ± 89,04	1,96 ± 3,05	323,17 ± 707,26
GDMP	141,38 ± 233,06	529,33 ± 736,26	0,32 ± 0,33	391,74 ± 233,25
GDMM	98,18 ± 49,25	294,98 ± 94,76	0,67 ± 1,51	508,67 ± 262,44
GDMMP	67,91 ± 36,75	294,98 ± 94,76	0,67 ± 0,97	493,62 ± 258,98
P	0,871	0,534	0,601	0,431

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão.

- Valores de referência para Alanina Aminotransferase - ALT* (57,55 ± 11,95) U/L, Aspartato Aminotransferase - AST** (131,33 ± 43,98) U/L, Gamaglutamil Transferase - GGT*** (3,47 ± 1,74) U/L e Fosfatase Alcalina - ALP**** (91,63 ± 28,70) U/L em ratos (LIMA et al 2014).

Tabela 3 - Peso corporal (g), peso hepático (g), índice hepatossomático - IHS (%) e níveis de glicose (ng/dL) de ratos Wistar adultos induzidos experimentalmente ao diabetes submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	Peso corporal	Peso hepático	IHS (%)	Glicose*
GD	265,3 ± 49,7	8,84 ± 1,8	3,6 ± 0,7	419,1 ± 28,1 ^a
GDM	306,3 ± 80,9	10,09 ± 0,9	3,2 ± 1,0	198,6 ± 142,4 ^b
GDMP	285,8 ± 70,6	8,36 ± 1,8	3,3 ± 1,7	170,0 ± 85,5 ^b
GDMM	272,5 ± 70,1	8,65 ± 1,4	3,4 ± 0,7	268,5 ± 149,4 ^a
GDMMP	275,5 ± 39,8	9,21 ± 0,8	3,4 ± 0,25	281,5 ± 99,4 ^a
p	0,826	0,300	0,984	0,009

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística.

- Valores de referência para glicose* (138,72 ± 30,17) ng/dL em ratos (LIMA et al 2014).

O fígado, devido sua associação direta com a manutenção da glicemia, é caracterizado como um dos órgãos mais afetados por mudanças metabólicas e moleculares que culminam em processos de deterioração das funções hepáticas (SADI, 2007). Após avaliação da glicemia plasmática constatou-se redução nos animais tratados somente com metformina e com a associação desta com a pentoxifilina (Tabela 3). Não foi observada, diferença para o índice hepatossomático e de peso corporal entre os grupos.

4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO FÍGADO

A densidade volumétrica relativa (%) dos constituintes hepáticos está registrada nas tabelas 5 e 6. De acordo com os resultados não houve diferença na densidade volumétrica relativa dos hepatócitos necróticos, hepatócitos mononucleados, hepatócitos binucleados, vasos e ductos biliares. No entanto, constatou-se uma tendência de redução no número de hepatócitos necróticos no grupo dos animais diabéticos tratados com metformina associada a melatonina. No grupo GDMMP o resultado semelhante ao descrito anteriormente. Contudo, no grupo GMM se constatou tendência de diminuição no número de hepatócitos binucleados.

Tabela 4 - Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	Hepatócitos necrótico	Hepatócitos mononucleados	Hepatócitos binucleados
GD	35,13 ± 3,29	32,13 ± 3,94	5,47 ± 19,6
GDM	37,33 ± 6,73	34,70 ± 8,92	5,53 ± 23,9
GDMP	38,91 ± 6,43	35,21 ± 6,64	5,53 ± 15,5
GMMM	28,42 ± 10,02	36,06 ± 6,09	3,18 ± 14,2
GDMMP	32,0 ± 12,26	40,92 ± 5,28	2,42 ± 10,8
P	0,314	0,261	0,805

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão.

Figura 1 - Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

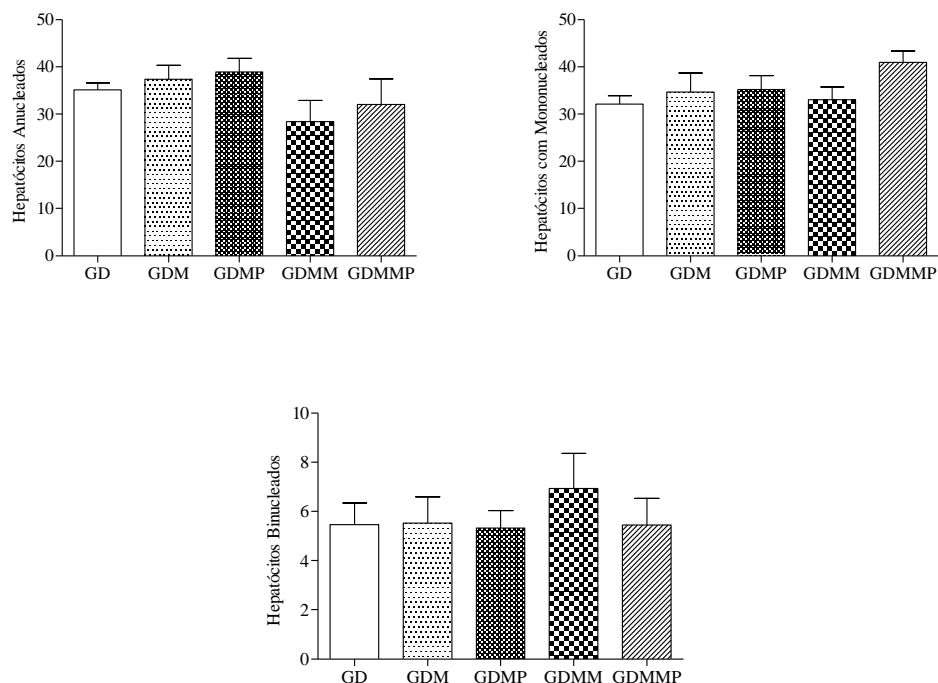


Tabela 5 - Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos (capilares sinusoides, células de Kupffer, vasos sanguíneos, ducto biliar e tecido conjuntivo) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

	Capilares sinusoides	Célula de Kupffer	Vasos sanguíneos *	Ducto biliar	Tecido conjuntivo
GD	17,51 ± 2,38 ^a	1,84 ± 1,00	6,87 ± 3,29	0,16 ± 0,45	0,88 ± 1,97
GDM	17,3 ± 5,66 ^a	2,41 ± 1,09	2,69 ± 1,50	0,02 ± 0,27	0
GDMP	13,23 ± 2,61 ^a	2,48 ± 0,88	8,65 ± 0,75	0,26 ± 0,18	0
GDMM	25,09 ± 2,85 ^b	1,95 ± 1,01	4,37 ± 2,92	0,15 ± 22	0
GDMMP	14,86 ± 4,15 ^a	5,38 ± 3,28	1,34 ± 1,85	0,05 ± 0,73	0
P	0,001	0,023	0,069	0,913	0,431

Fonte: Autor, 2017.

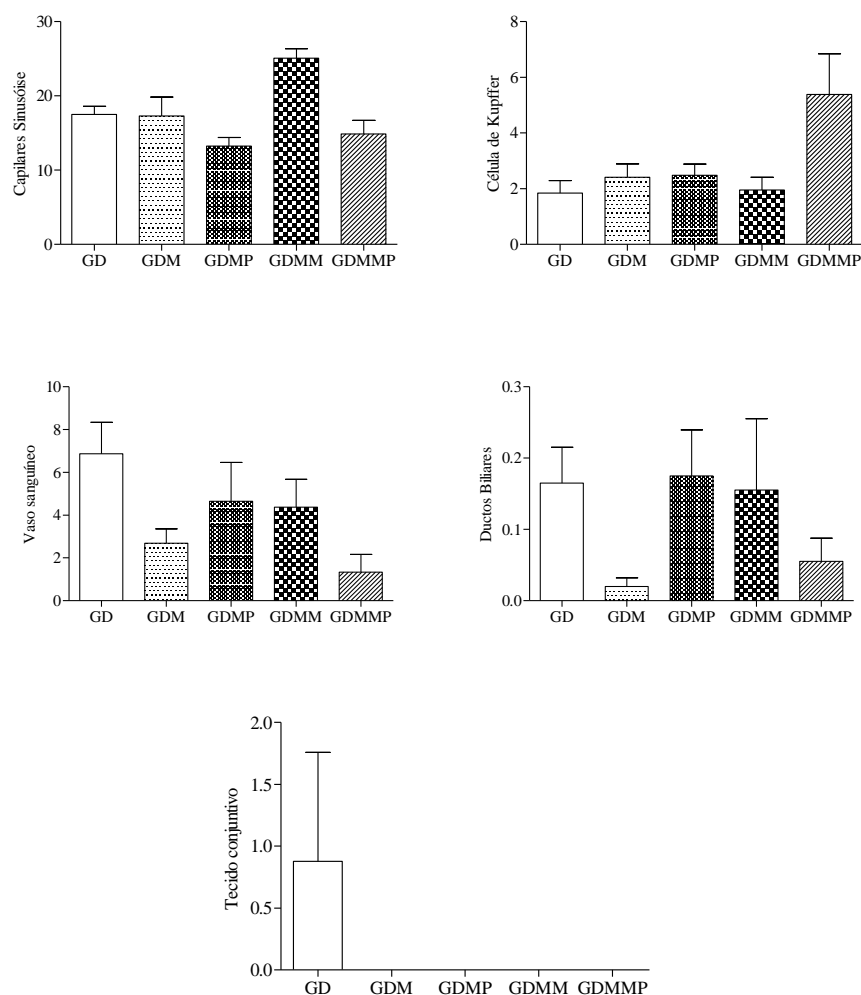
Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença estatística.

- *Artérias e veias hepáticas.

Com relação ao percentual de capilares sinusoides, o grupo tratado com metformina associada à melatonina teve maior densidade volumétrica em relação aos demais grupos

(Tabela 5; Figura 2). Por outro lado, não houve diferença significativa entre os grupos para os percentuais de células de Kupffer e vasos sanguíneos (veia centro lobular, artéria e veia hepática). Embora o grupo tratado com metformina, melatonina e pentoxifilina tenha apresentado um percentual elevado de células de Kupffer (19%) em relação ao controle. Este dado não foi considerado significativo em relação aos demais grupos experimentais (Tabela 5; Figura 2).

Figura 2 - Densidade volumétrica (%) dos componentes hepáticos (capilares sinusóides, células de Kupffer, vasos sanguíneos, ducto biliar e tecido conjuntivo) de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



4.3 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DO FÍGADO

Nos animais do grupo diabético foram constatadas alterações hepáticas relacionadas à necrose de hepatócitos, degeneração gordurosa micro e macrovesicular, à esteatohepatite e à fibrose periportal associados à presença de dilatação dos capilares sinusoides e perda progressiva da estrutura geral do órgão (Tabela 6; Figura 3A e 3B). A doença hepática gordurosa não alcoólica pode ser associada à obesidade, ao diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e a resistência à insulina inclui, em seu espectro, desde a esteatose simples e apenas acúmulo de gordura no fígado, até esteatohepatite com componente necroinflamatório, com ou sem fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (SCHILD et al., 2013; ZHANG et al., 2014). Sabe-se que o estresse oxidativo celular tem importante papel na gênese e evolução das lesões diabéticas crônicas sobre os vasos, rins, retina e nervos, e muito possivelmente, também, sobre o fígado de homens e animais diabéticos (EVELSON et al., 2005; KHAN; FARHANGKHOE e CHAKRABARTI, 2006; KANETO et al., 2006).

Segundo Méndez-Sánchez et al. (2004), a persistência de um estado diabético e de estresse crônico das células hepáticas parece ser um dos fatores preditivos mais importantes para o desenvolvimento de cirrose em pacientes diabéticos com degeneração gordurosa do fígado de etiologia não-alcoólica (DGFNA), particularmente nos obesos.

As lesões hepáticas dos animais pertencentes ao grupo diabético tratado com metformina foram semelhantes em todos os fígados com presença de grande quantidade de hepatócitos binucleados, hepatócitos necróticos distribuídos aleatoriamente pelo parênquima hepático e hipertrofia dos hepatócitos com conseqüente diminuição dos capilares sinusoides delgados (Tabela 6,7, Figura 3C e D) e subseqüente prejuízo à microcirculação (KARABULUT et al., 2004). Observou-se também infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos, proliferação de ductos biliares e células de Kupffer mais visíveis. As células de Kupffer estão envolvidas na defesa do organismo contra agentes infecciosos e materiais tóxicos da circulação portal (CULLEN, 2009). Estas células, assim como os hepatócitos, produzem grandes quantidades de radicais livres em resposta ao danos celular e podem ter esta atividade amplificada com o esgotamento dos mecanismos antioxidantes (FRIEDMAN; ARTHUR, 2002). No diabetes ocorre aumento do estresse oxidativo e dano ao hepatócito com conseqüente ativação de células de Kupffer e outras células

inflamatórias (WEILER-NORMANN; HEKEL; LOHSE, 2007). Isto justifica em parte os achados descrito no grupos GD e GDM que não possuem no tratamento fármacos considerados antiinflamatórios atípicos e antioxidantes.

Tabela 6 - Intensidade das lesões renais de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

Lesões histopatológicas	GD	GDM	GDMP	GDMM	GDMMP	P
Macroesteatose	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,9	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,8	1,7 ± 0,8	0,567
Microesteatose	0,4 ± 0,9	0,6 ± 1,3	2,6 ± 2,1	1,2 ± 2,2	0,6 ± 1,3	0,19
Hipertrofia de hepatócitos	1,4 ± 0,8	2,8 ± 1,6	4,2 ± 0,4	3,2 ± 1,3	4,2 ± 0,4	0,002
Necrose hepática	3,0 ± 0,0	3,2 ± 0,4	3,4 ± 0,5	3,0 ± 0,0	3,2 ± 0,4	0,431
Congestão de veia centrolobular	0,0 ± 0,0	1,8 ± 1,7	1,4 ± 1,1	1,2 ± 0,8	1,2 ± 1,6	0,260
Congestão do parênquima hepático	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,5	0,8 ± 0,4	1,4 ± 1,1	0,4 ± 0,5	0,03
Atrofia de cordões de hepatócitos	2,4 ± 1,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,001
Dilatação de sinusoides	2,2 ± 1,9	0,4 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,006
Estreitamento de sinusoides	0,8 ± 0,8	2,2 ± 1,8	4 ± 0,7	2,8 ± 1,3	4,2 ± 0,4	0,001

Fonte: Autor, 2017.

Notas - Os valores representam a média ± desvio padrão.

- Escores de lesões: 0 - ausência, 1 - leve, 2 - leve a moderada, 3 - moderada, 4 - moderada a intensa e 5 - intensa.

Tabela 7 - Frequência das lesões hepáticas de ratos Wistar adultos induzidos ao diabetes experimental e submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.

Lesões histopatológicas	Grupos experimentais						
	GD (n=5)	GDM (n=5)	GDMP (n=5)	GDMM (n=5)	GDMMP (n=5)	FA (%)	FR (%)
Macroesteatose	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	3 (60%)	1 (20%)	9	36
Microesteatose	1 (20%)	1 (20%)	4 (80%)	2 (40%)	1 (20%)	9	36
Hipertrofia de hepatócitos	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	2	92
Necrose	5 (100%)	4 (80%)	5 (100%)	5 (100%)	5 (100%)	24	96
Congestão de vasos	-	2 (40%)	4 (80%)	4 (80%)	3 (60%)	24	96
Congestão de parênquima	-	-	4 (80%)	4 (80%)	2 (40%)	10	40
Atrofia de cordões de hepatócitos	5 (100%)	-	-	-	-	5	20
Dilatação de sinusoides	5 (100%)	-	-	-	-	5	20

Fonte: Autor, 2017.

Notas – FA: Frequência absoluta, FR: Frequência relativa.

A ação da metformina no fígado reduz a atividade de enzimas chaves na síntese de triacilglicerol e colesterol e estimula o catabolismo de lipídios, e bloqueio na produção hepática de glicose (HARDIE, 2013). Ratos alimentados com dieta hiperlipídica que receberam 250 mg/kg de metformina apresentaram aumento da fosforilação da adenosina monofosfato (AMPK), uma enzima que atua como regulador metabólico (MILLER, 2013).

No presente estudo, nos animais tratados com metformina e pentoxifilina constatou-se presença de hepatócitos volumosos com esteatose microvesicular e áreas de necrose de coagulação (Tabelas 6,7). Na busca de alternativas que possam ser úteis no tratamento da lesão hepática não alcoólica, a pentoxifilina, por causar diminuição na produção de citocinas pró-fibróticas, vem sendo empregada em estudos com humanos e animais visando a redução da esteatose (VAN et al., 2011; ZEIN et al., 2011).

Nos animais diabéticos tratados com metformina em associação com melatonina, constatou-se tendência de aumento na hiperplasia e hipertrofia hepática, estreitamentos capilares de sinusoides, discreta microesteatose e necrose de coagulação (Tabela 6), e hepatócitos binucleados. Guven et al., (2006) estudando os efeitos protetores da melatonina sobre as lesões do fígado de ratos diabéticos observaram congestão dos sinusoides e degeneração hidrópica, necrose focal e degeneração gordurosa microvesicular dos hepatócitos, associados à inflamação periportal moderada. Estes autores, no entanto, não observaram degeneração gordurosa macrovesicular e fibrose hepática evidenciando, muito possivelmente, o caráter crônico destas alterações.

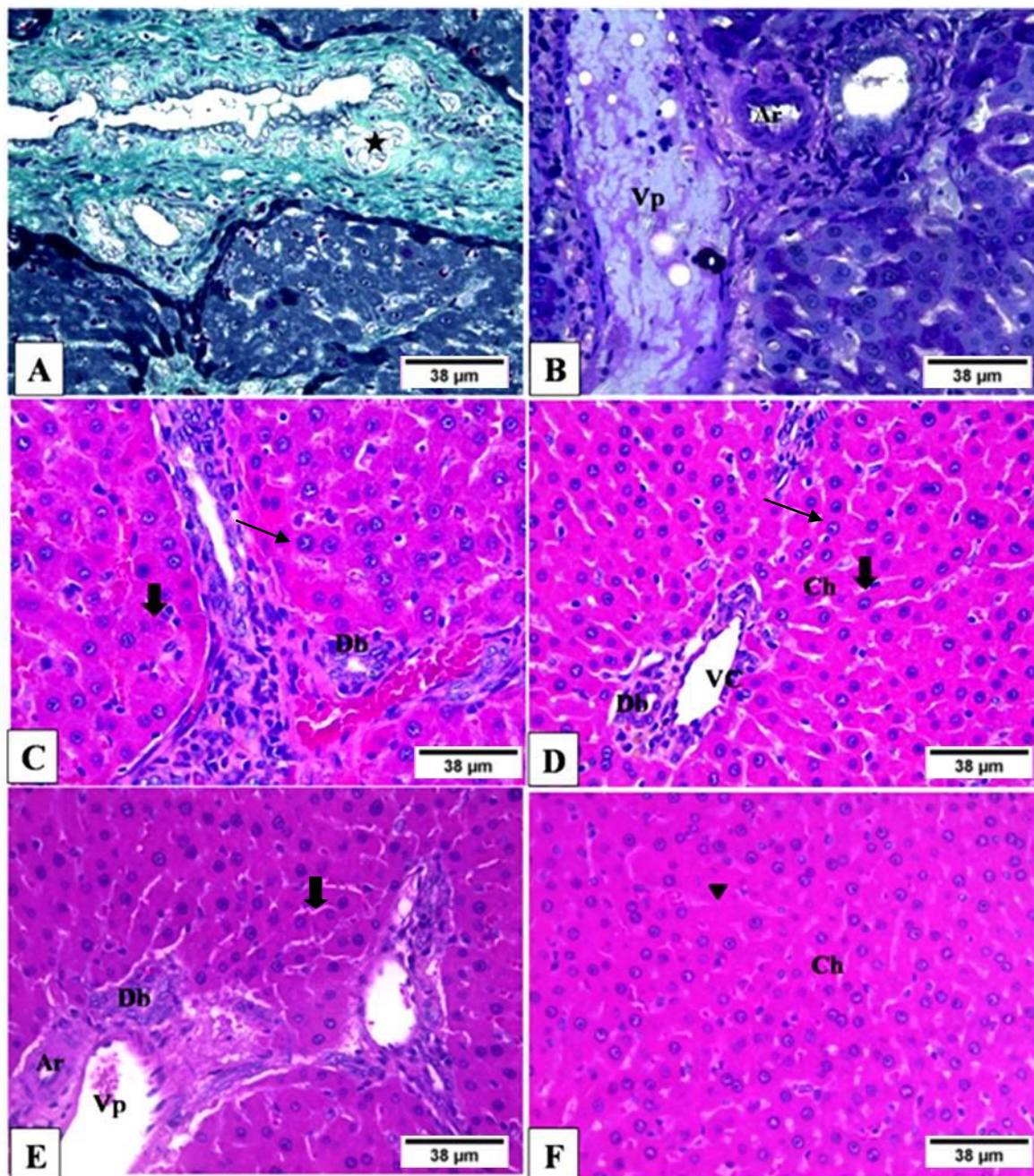
Segundo Birkner et al. (2007) a administração prolongada de dieta hipercolesterolêmica é capaz de alterar estruturas de hepatócitos e levar a formação de esteatose, o que ocorreu em nosso modelo de diabetes mellitus de forma mais evidente, no entanto com intensidade de leve a moderada nos grupos GMP e GMM (Tabela 6, figuras 4A, B). Provavelmente, devido à capacidade da melatonina em reduzir o dano hepático, a lipoperoxidação, o colágeno no fígado e aumentar a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (ROSA et al., 2008).

Nos animais do grupo metformina, pentoxifilina e melatonina notaram-se hepatócitos com esteatose discreta, generalizada, do tipo microvesicular em apenas um dos animais (Tabela 7, Figuras 4C, D). Nos outros animais constatou-se estreitamento dos sinusoides, tumefação celular difusa, presença de hepatócitos binucleados, congestão dos

capilares sinusoides, necrose de coagulação de hepatócitos e hiperplasia de ductos biliares. As alterações descritas anteriormente foram ausentes ou variaram entre moderada-intensa.

A progressão da esteatose hepática está relacionada à ação de citocinas pró-inflamatórias e ao estresse oxidativo (LEITE; JAMAR, CANTARI, 2014). Ou seja, o uso de um anti-inflamatório atípico (PTX) capaz de reduzir os níveis de TNF- α (ANTUNES et al., 2008) e mediadores pró-inflamatórios (D'HELLENCOURT et al, 1996; RAMANI et al 1994) e um potente antioxidante (melatonina) associados à metformina minimizaram as lesões decorrentes da hiperglicemia.

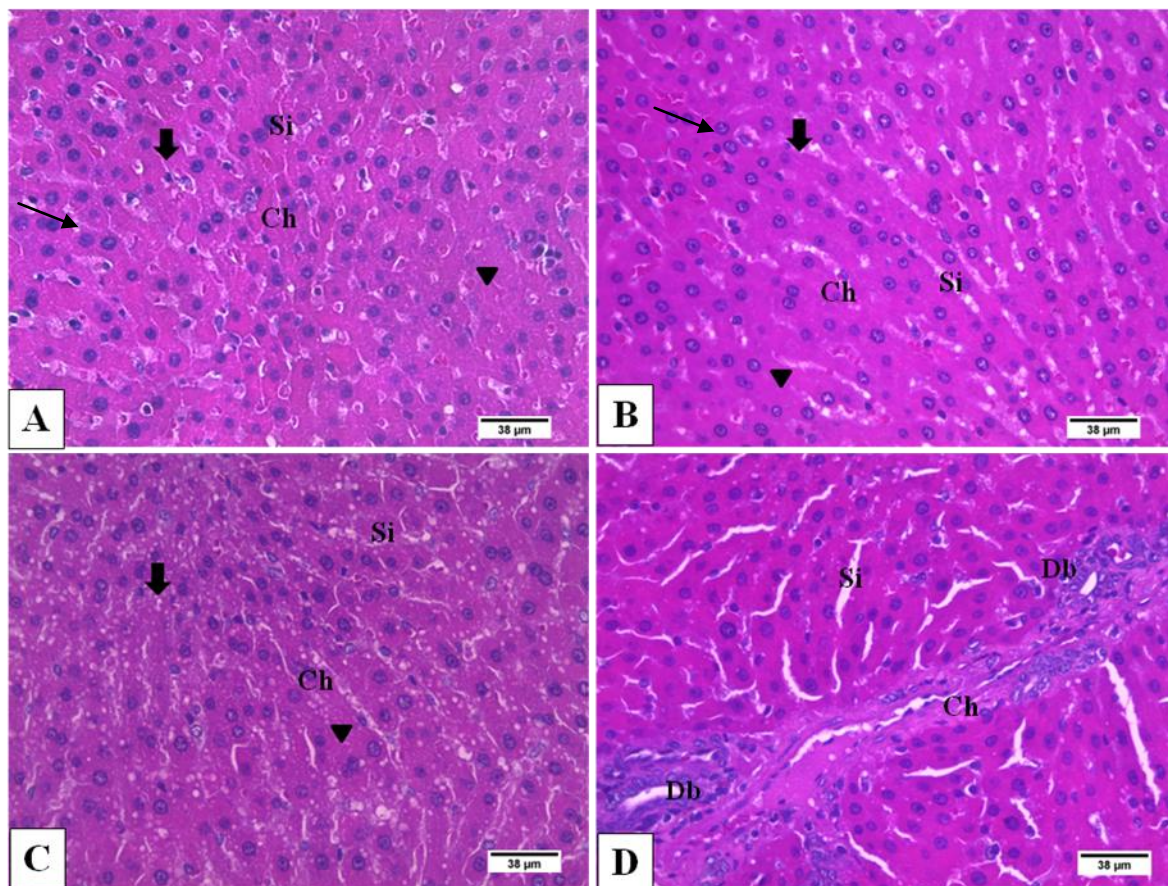
Figura 3. Fotomicrografia de fígado ratos Wistar induzidos experimentalmente ao diabetes submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



Fonte: Autor, 2017.

Notas - **A:** parênquima de fígado do grupo diabético sem tratamento com presença de Fibrose (estrela). Tricrômico de Gomori. **B:** parênquima de fígado do grupo controle mostrando veia porta (Vp), artéria (Ar). PAS. **C:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina com hepatócitos hipertrofiados com núcleos grandes (seta longa); estreitamento de sinusoides (Seta); hiperplasia de ductos biliares (Db). HE. **D:** cordões hepáticos (Ch) hipertrofiados do grupo diabético tratado com metformina com hepatócitos com núcleos grandes (seta longa); estreitamento de sinusoides (Seta); Ducto biliar (Db); Veia (Vc). HE. **E:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina e pentoxifilina estreitamento de sinusoides (Seta); hiperplasia de ducto biliar (Db); Veia porta (Vp) e artéria (Ar). HE. **F:** cordões hepáticos (Ch) do grupo diabético tratado com metformina e pentoxifilina com estreitamento de sinusoides (Seta), necrose de hepatócitos (cabeça de seta). HE.

Figura 4. Fotomicrografia de fígado ratos Wistar induzidos experimentalmente ao diabetes submetidos à dieta hiperlipídica e tratados com metformina, pentoxifilina e melatonina.



Fonte: Autor, 2017.

Notas - **A:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina e melatonina com hepatócitos com núcleos grandes (seta longa); estreitamento de sinusoides (Seta). Necrose de hepatócitos (cabeça de seta). HE. **B:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina e melatonina com hepatócitos com núcleos grandes (seta longa); estreitamento de sinusoides (Seta); necrose de hepatócitos (cabeça de seta). HE. **C:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina, melatonina e pentoxifilina com hepatócitos com formação de degeneração gordurosa microvesicular (Seta); necrose de hepatócitos (cabeça de seta). HE. **D:** parênquima de fígado do grupo diabético tratado com metformina, melatonina e pentoxifilina com hepatócitos com formação de degeneração gordurosa microvesicular de intensidade leve; hipertrofia de ductos biliares (Db), sinusoides (Si). HE.

5 CONCLUSÕES

A utilização da metformina associada à pentoxifilina reduziu significativamente os níveis glicêmicos, porém não foi suficiente para minimizar os danos hepáticos. A associação de metformina com a melatonina e pentoxifilina influenciou na redução dos níveis séricos de ALT e nos danos compatíveis com a doença hepática gordurosa não alcoólica em animais diabéticos submetidos à dieta hiperlipídica.

REFERÊNCIAS

AHMADIEH, H; AZAR S.T, “Liver disease and diabetes: association, pathophysiology, and management,” **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 104, n. 1, p. 53-62, 2014.

ANTUNES, A. S.; TEIXEIRA, M. C. B.; JÚNIOR, A. G. Efeitos da pentoxifina na anemia resistente à eritropoetina em pacientes sob hemodiálise. **Ver. Bras. Hematol.**, v. 30, n. 4, p. 303-308, 2008.

BIRKNER, E. et al. The influence of methionine, selenomethionine, and vitamin E on liver metabolic pathways and steatosis in high-cholesterol fed rabbits. **Boil. Trace Elem. Res.**, v. 120, n. 1-3, p. 179- 194, 2007

BOSQUES-PADILLA, F., et al. Gastroenterology diagnosis and treatment guidelines of non alcoholic hepatic disease. **Ver. Gastroenterol. Mex.**, v. 73, n. 2, p.129-133, 2008.

Brunt, E. M. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. **Nat. Ver. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, p. 195–203, 2010.

CHAVES, G.V. et al. Associação entre doença hepática gordurosa não alcoólica e marcadores de lesão/função hepática com componentes da síndrome metabólica em indivíduos obesos classe III. **Rev. Assoc. Med. Bras.**; v. 58, n. 3, p. 288-329, 2012.

CULLEN, J. M. Fígado, sistema biliar e pâncreas bexócrino. *In*: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. Bases da Patologia em Veterinária. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p393-462, 2009.

D’HELLEN COURT et al. Differential regulation of TNF- alpha, IL-6, IL8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifyline. **Int. J. Immunopharmacol.**, v. 18, n. 12, p. 739-748, 1996.

EVELSON, P. et al. Hepatic morphological changes and oxidative stress in chronic streptozotocin-diabetic rats. **Ann. Hepatol.**, v. 4, n. 2, p. 115-120, 2005.

FARRELL, C. G., LARTER, C. Z. “Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis,” **Hepatology**, v. 43, p. 99-112, 2006.

FRANCO, L. D. P.; CAMPOS, J. A. D. B.; DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Rev. Nutr.**, v. 22, n. 3, P. 359-366, 2009.

FRIEDMAN S. L., ARTHUR, M. J. P. Reversing hepatic fibrosis. **Sci. Med.**, v. 88, p. 125-172, 2002.

GUPTA, A. et al. Pioglitazone, but not metformin, reduces liver fat in type-2 diabetes mellitus independent of weight changes. **J. Diabetes Complicat.**, v. 24, n. 5, p. 289-296. 2010.

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

HANLEY, A. J. G. et al. Liver markers and development of the metabolic syndrome. Insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes**, v. 4, p. 3140-3147, 2005.

HARDELAND, R. et al. Melatonina a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. **Prog. Neurobiol.**, v. 93, n.3, p. 350-84.2011.

HARDIE, D. G. AMPK: A target for drugs and natural products with effects on on both diabetes and cancer. **Diabetes**, v. 62, n.7, p.2164-2172. 2013.

HARDIE, D. G.; HAWLEY, S. A.; SCOTT, J. W. AMP-activated protein kinase - development of the energy sensor concept. **J. Physiol.**, v. 574, n. 1, p. 7-15. 2006.

KANETO, H. et al. Role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and c-Jun N-terminal 64 kinase in pancreatic beta-cell dysfunction and insulin resistance, **Int J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 38, pp. 782-793, 2006.

KARABULUT, N., et al. doppler waveform of the hepatic veins in on obese population. **Eur. Radiol**, v.14, p. 2268-2272, 2004.

KHAN, Z.A.; FARHANGKHOE, H. and CHAKRABARTI, S. Towards molecular targets for chronic diabetic complication. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 4, pp. 45-57, 2006.

LEITE, B. F.; JAMAR, G.; GARANTI, D. A. Efeito dos ácidos graxos na síndrome metabólica: uma revisão de literatura. **Nutrire: Ver. Soc. Bras.**, v. 39, n. 1, p. 113-129, 2014.

LIMA et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

MARTINO, Rodrigo Bronze de. Avaliação do emprego da pentoxifilina na regeneração hepática em ratos submetidos à hepatotectomia parcial. Esse apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em ciências. São Paulo. 2010

MÉNDEZ-SÁNCHEZ, N.; CHÁVEZ-TAPIA, N. C.; URIB, M. An update on nonalcoholic fatty liver disease. **Rev. Invest. Clin.**, v. 56, p. 72-82, 2004.

MILLER, R.A. et al Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 256–260, 2013.

MORAES, Maria Silmara de. Avaliação do estresse oxidativo no intestino de ratos submetidos à carcinogênese hepática e ação da melatonina. (2014). Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade federal do Rio Grande do Sul.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica: princípios e interpretações. medbook, 2009.

NELSON, D.L. e COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª Edição. p.922, 2011.

ORTIZ-LOPEZ, C. et al. Prevalence of prediabetes and diabetes and metabolic profile of patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Diabetes Care**, v. 35, p.873-878. 2012.

RAMANI, M. et al. Interleukin-10 and pentoxifyline inhibit C- reactive protein-induced tissue factor gene expression in peripheral human blood monocytes. **FEBS Lett**, v. 356, n. 1, p. 86-88, 1994.

ROSA, D. P.; BONA, S.; MARRONI, N. A. P. Papel da melatonina no estresse oxidativo do fígado e sangue de ratos cirróticos. **Rev. de inic. Cient. da ULBRA**. 2008

ROSKAMS, T. et al. Diehl, "Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease," **Am. J. Pathol.**, v. 163, pp. 1301-1311, 2003.

SADI, G.; YILMAZ, Ö; GÜRAY, T. Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 309, n1-2, p. 109-116, 2007.

SANTOS, J. C. A. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, p. 1-14, 2008.

SHILD, B.Z.; SANTOS, L, N. e ALVES, M.K. Doença hepática gordurosa não alcoólica e sua relação com a síndrome metabólica no pré-operatório de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica. **Ver. Assoc. Med Bras.**, v. 59, n. 2, p.155-160, 2013.

SILVA, J. H.; ESCANHOELA, C. A. F. Doença hepática gordurosa não alcoólica: patogênese e achados histopatológicos com ênfase nas alterações mitocondriais. **Rev. Ciên. Méd.**, v. 18, n. 5/6, p. 269-279, 2009.

SMITH, B. W.; ADAMS, L.A. "Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment," **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 7, n. 8, p. 456-465, 2011.

TOLOSA E.M.C. et al. **Manual de técnicas para histologia**. Normal e Patológica. 2ed. Barueri SP:Manole, 2003.

VAN WAGNER, L. B. et al. Pentoxifyline for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a randomized controlled trial. **Ann. Hepatol.**, v. 10, n.3, p. 277-286, 2011.

WEILER-NORMANN, C.; HERKEL, J.; LOHSE A. W. mouse models of liver fibrosis. **Gastroenterol**, v. 45, n. 1, 43-50, 2007.

ZEIN, C. O. et al. Pentoxifyline improves nonalcoholic steatohepatitis: a randomized placebo-controlled trial. **Hepatology**, v. 54, p. 1610-1619, 2011.

ZHANG, Q. et al. Prediction of metabolic syndrome by non-alcoholic fatty liver disease in northern urban Han Chinese population: a prospective cohort study. **PLoS ONE**, v.9, n.5, 2014.