



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

**MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA**

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

**RECIFE**

**2018**

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

**MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA**

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

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

**Orientador:**

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

**Co-orientador (a):**

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

**RECIFE**

**2018**

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

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

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

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

CDD 636.089

**MARINA GOMES PESSOA BAPTISTA**

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

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

**20 de Fevereiro de 2018**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

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

---

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

---

**Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ismaela Maria Ferreira de Melo - UNIBRA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório – UFPE**

**RECIFE  
2018**

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

## **ABSTRACT**

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

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



## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

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

### CAPÍTULO II

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

## Lista de Figuras

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

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

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

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

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

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

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

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

## 1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

## 101 **2. Revisão de Literatura**

102

### 103 **2.1 Diabetes Mellitus**

104

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

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

123 Em todo o mundo esta doença representa um elevado impacto econômico. Nos  
124 Estados Unidos, por exemplo, os custos com a doença chegaram a aproximadamente  
125 132 bilhões de dólares no ano de 2002 (LIRA et al., 2006), aumentando ainda mais  
126 no ano de 2007, no qual foram registrados gastos de aproximadamente 174 bilhões  
127 de dólares. Assim, estima-se que até o ano de 2020, este custo possa chegar a 192  
128 bilhões. Atualmente no Brasil, 2,2% do orçamento do ministério da saúde representa  
129 as despesas do DM no país, e acredita-se que esse número possa se expandir com  
130 o aumento do número de portadores (BAVARESCO et al., 2016).

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

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

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

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

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

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



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

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

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

199 Diante da origem das complicações crônicas do DM, a questão mais  
200 importante que vem desafiando pesquisadores e profissionais de saúde é o controle  
201 da glicemia (ARAUJO et al., 2010). Diversos tratamentos para o DM têm sido  
202 sugeridos. Entre os tratamentos farmacológicos, a insulina e o hipoglicemiante oral  
203 (Metformina e Sulfoniluréia) são os principais recomendados pelo Ministério da Saúde  
204 Brasileiro (BAVARESCO et al., 2016). Estudos mostraram que tanto a administração  
205 de metformina como a mudança dos hábitos nos indivíduos (por exemplo dietas e  
206 exercícios físicos) reduziram a ocorrência do DM2 (SANTOMAURO-JUNIOR et al.,  
207 2008).

208

## 209 **2.2 Cérebro e complicações cerebrais do diabetes mellitus**

210

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

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

226 O cérebro contém a segunda maior quantidade de lipídeos do corpo com 36-  
227 60% de lipídeos, ficando atrás apenas do tecido adiposo. Os lipídeos no cérebro são  
228 considerados complexos, e esse grupo inclui glicerofosfolídeos, esfingolípídeos,  
229 gangliósídeos e colesterol (SINCLAIR et al., 2007). Este órgão é considerado  
230 diferenciado pois apresenta uma taxa metabólica elevada. Isso se deve ao fato deste  
231 órgão consumir aproximadamente 20% do oxigênio inspirado durante o repouso. Essa

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

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

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

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

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

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

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

267 Uma das principais complicações cerebrais ocasionadas pelo DM esta a  
268 neuropatia diabética, que foi reconhecida pela primeira vez por Marchal de Calvi em  
269 1864 (NASCIMENTO et al., 2016). A neuropatia diabética (ND) pode ser definida  
270 como um dano neurológico em pacientes que apresentam o diabetes mellitus (DM),  
271 na qual esta desordem pode ser demonstrada de forma clinica ou subclanicamente,  
272 decorrente do aparecimento do diabetes mellitus sem outros fatores para neuropatia.  
273 Esta complicação afeta neurônios sensoriais periféricos, sendo comum tanto no tipo  
274 1 como no tipo 2 (FENG et al., 2016). As manifestações no sistema nervoso somático  
275 e autônomo incluem-se nas modificações neuropáticas do diabetes (SCHIMID,  
276 2007).

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

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

289 Para estabilização e melhora das complicações cerebrais, assim como para a  
290 neuropatia diabética é necessário um controle glicêmico rigoroso, para que seja  
291 possível manter o paciente em um estado de normoglicemia (TESFAYE et al., 2010).  
292 Diversas evidências indicam que o estresse oxidativo está envolvido nas  
293 complicações causadas pelo diabetes no cérebro, fazendo com que fármacos  
294 antioxidantes sejam uma excelente alternativa de tratamento (NASCIMENTO et al.,  
295 2016).

296

297

## 298 **2.3 Melatonina**

299

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

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

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

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

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

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

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

352 Na apoptose, processo definido pela morte programada das células, a  
353 melatonina apresenta ação na via extrínseca modulando os receptores de morte,  
354 assim como também na via intrínseca quando elimina radicais oxidantes do  
355 citoplasma que podem ser originados pela mitocôndria. A melatonina pode interagir  
356 com receptores nucleares exercendo ação genômica direta, modificando a expressão  
357 dos genes do apoptose, e dessa maneira inibindo a morte celular (FERREIRA et al.,  
358 2010).

359

## 360 **2.4 Melatonina e Diabetes**

361

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

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

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

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

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

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

402

## 403 **2.5 Melatonina no cérebro**

404

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

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

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

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



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

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

439

## 440 **2.6 Citocinas inflamatórias e diabetes**

441

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

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

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

463 portadores de diabetes apresentam níveis maiores de concentração plasmática de  
464 citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$ , onde estes podem potencializar  
465 quadros de inflamação (SAMUEL et al., 2012).

466

### 467 **2.6.1 Interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )**

468

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

484 O fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) pode ser produzido por macrófagos  
485 ativados, linfócitos e monócitos (BINGHAM, 2002), e tem a presença de  
486 lipopolissacarídeos como estímulo para sua produção (VITALLE; RIBEIRO, 2007).  
487 Após sua produção e liberação, o TNF- $\alpha$  irá se ligar a receptores específicos  
488 chamados de TNF- R I e II, para que possa realizar seu efeito biológico. Além disso,  
489 estes receptores podem estimular o início do processo de apoptose (ABBAS et al.,  
490 1998).

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

495

## 496 **2.7 Insulina no cérebro**

497

498 Em resposta aos elevados níveis de glicose, as células  $\beta$  do pâncreas secretam  
499 a insulina, um hormônio anabólico, essencial para a manutenção da homeostase da  
500 glicose e também para o crescimento e diferenciação celular. A regulação da  
501 homeostase por esse hormônio ocorre em diversos níveis, reduzindo a produção  
502 hepática da glicose, sendo esta captada em maior proporção nos tecidos muscular e  
503 adiposo (CARVALHEIRA et al., 2002). Apesar da glicose ser o principal determinante  
504 fisiológico para estimular a secreção de insulina, agentes farmacológicos como as  
505 sulfonilureias também demonstraram exercer efeitos estimulantes (JOSHI et al.,  
506 2007).

507 A ação da insulina na célula se inicia através da sua ligação ao receptor  
508 presente na membrana plasmática, e assim a absorção da glicose por células é feita  
509 através do transportador de glicose conhecido como GLUT 2 (JOSHI et al., 2007). Em  
510 quase todos os tecidos dos mamíferos é possível encontrar o receptor deste  
511 hormônio, entretanto sua concentração apresenta uma variação, desde 40 receptores  
512 nos eritrócitos até mais de 200.000 em células adiposas e hepáticas (HABER et al.,  
513 2001).

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

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

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

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

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

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

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

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

560

561

562 **3. REFERÊNCIAS**

563 ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Citocinas. **Imunol. Cel. Mol.** v. 2, p.  
564 253-276, 1998.

565 AKKAS, S. B.; INCI, S.; ZORLU, F. et al. Melatonin affects the order, dynamics, and  
566 hydration of brain membrane lipids. **J. Mol. Struc.** v. 836, p. 207-215, 2007.

567 ALEXANDRAKI, K.; PIPERI, C.; KALOFOUTIS, C. et al. The inflammatory process in  
568 type 2 diabetes. The role of cytokines. **Ann. N. Y. Acad. Science.** v. 1084, p. 89-117,  
569 2006.

570 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes  
571 mellitus. **Diabetes Care.** v. 37, n. 1, p.14-80, 2014.

572 AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes.  
573 **Diabetes Care.** v. 38, n. 1, 2015.

574 ARAÚJO, M. F. M.; GONÇALVES, T. C.; DAMASCENO, M. et al. Aderência de  
575 diabéticos ao tratamento medicamentoso com hipoglicemiantes orais. **Esc. Anna**  
576 **Nery.** v. 14, n. 2, p. 361-367, 2010.

577 ARRUDA, J. L.; SWEITZER, S.; RUTKOWSKI, M.D. et al. Intrathecal anti-IL-6  
578 antibody and IgG attenuates peripheral nerve injury-induced mechanical allodynia in  
579 the rat: possible immune modulation in neuropathic pain. **Brain Res.** v. 879, p. 216-225,  
580 2000.

581 BALDONI, N. R.; AQUINO, J. A.; SANCHES-GIRAUD, C. et al. Collective  
582 empowerment strategies for patients with diabetes mellitus: A systematic review and  
583 meta-analysis. **Prim. Care Diabetes.** v. 11, p. 201-211, 2017.

584 BANKS, W. A.; OWEN, J. B.; ERICKSON, M. Insulin on the brain: there and back  
585 again. **Pharmacol. Ther.** v. 136, n. 1, p. 82-93, 2012.

586 BARABAS, M. E.; MATTSON, E. C.; ABOUALIZADEH, E. et al. Chemical structure  
587 and morphology of dorsal root ganglion neurons from naive and inflamed mice. **J. Biol**  
588 **Chem.** v. 289, n. 49, p. 241-249, 2014.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

861

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

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

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

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

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

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

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

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

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

886 ZEPHY, D.; AHMAD, J. Type 2 diabetes mellitus: role of melatonina and oxidative  
887 stress. **Diabetes Metab. Syndr.** v. 9, p. 127-131, 2015.  
888  
889



## CAPÍTULO II

890

891

892

893 Avaliação histomorfométrica e imunohistoquímica do córtex cerebral frontal em ratos

894 diabéticos após o tratamento com melatonina

895

896

897 Marina Gomes Pessoa Baptista<sup>1</sup>, Cintia Giselle Martins Ferreira<sup>1</sup>, Valéria Wanderley

898 Teixeira<sup>1</sup>, Álvaro Aguiar Coelho Teixeira<sup>1\*</sup>

899

900

901

902 <sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia

903 Animal, Recife, Brasil.

904

905

906

907 \*Autor para correspondência: UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n Dois Irmãos-

908 Recife-PE-Brazil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389 E-mail: alvaro.teixeira@ufrpe.br

909 (TEIXEIRA, A.,A.,C.)

910

911

912

913

914

915 **RESUMO**

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

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

939

940 **ABSTRACT**

941 It is known that the central nervous system is vulnerable to complications caused by  
942 diabetes. This complications leads to increased oxidative stress in the brain, resulting in damage  
943 to the cerebral cortex among other regions. Insulin and hypoglycemic agents are still the most  
944 widely used treatments, however, current research with an experimental model of diabetes  
945 suggests the use of antioxidants, such as melatonin. Thus, we tested the hypothesis that  
946 exogenous melatonin may decrease or prevent the effects of diabetes in the frontal cortex of rat  
947 brain. Fifty albino rats were divided into 5 groups: **GC**: rats without diabetes induction; **GD**:  
948 diabetic rats induced by streptozotocin; **GDM**: streptozotocin-induced and melatonin-treated  
949 diabetic rats; **GDI**: diabetic rats induced by streptozotocin and treated with insulin; **GDMI**:  
950 diabetic rats induced by streptozotocin and treated with melatonin and insulin simultaneously.  
951 Diabetes was induced by intraperitoneal administration of streptozotocin (60 mg/kg). Insulin (5  
952 U/day) was administered subcutaneously and melatonin (10 mg/kg) by drinking water. Both  
953 treatments were performed for 30 days after induction. The animals' weight, the cytokines IL-  
954 6 and TNF- $\alpha$ , apoptosis, glycogen, and morphometry and histopathology of the frontal cortex  
955 were analyzed. The results showed that the cerebral cortex of the diabetic animals presented  
956 axonal degeneration, reduced number of neurons in the cortex, reduced glycogen, increased IL-  
957 6 and TNF- $\alpha$  expression, elevated apoptotic index, and reduced animal weight and the brain.  
958 Treatment with melatonin associated or not with insulin prevented such effects. Thus, we  
959 conclude that melatonin associated or not with insulin may be an alternative in preventing the  
960 effects of diabetes in the frontal cortex of the brain.

961

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

963

964

## 965           **1.     Introdução**

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

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

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

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

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

993 Diversos estudos apontam a melatonina como um antioxidante e um eliminador de  
994 radicais, por estimular a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e  
995 glutathione redutase (EL-SOKKARY et al., 2003). Este hormônio também desempenha um  
996 importante papel na neuroproteção de diversos distúrbios neurodegenerativos cuja patogênese  
997 envolve espécies reativas de oxigênio (BAYDAS et al., 2001), além de possuir efeitos anti-  
998 inflamatório e modular o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6)  
999 (HERNANDEZ-VELAZQUEZ et al., 2016). Assim, testamos a hipótese de que a melatonina  
1000 exógena pode diminuir ou prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do cérebro de ratos.

1001

## 1002 **2. MATERIAL E MÉTODOS:**

1003

1004 O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de  
1005 Morfologia e Fisiologia animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram  
1006 utilizados 50 ratos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), com 60 dias de idade, virgens, pesando  
1007 aproximadamente  $\pm$  250 g, da linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de  
1008 Morfologia e Fisiologia Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os  
1009 animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*, permanecendo em  
1010 condições padrões de  $\pm$  22 °C com período de luz entre 06:00 - 18:00 horas, divididos nos  
1011 seguintes grupos:

1012

1013 **Grupo GC:** Ratos sem a indução ao diabetes;

1014 **Grupo GD:** Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina;

1015 **Grupo GDI:** Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com insulina;  
1016 **Grupo GDM:** Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina;  
1017 **Grupo GDMI:** Ratos induzidos ao diabetes pela estreptozotocina e tratados com melatonina e  
1018 insulina simultaneamente.

1019 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética institucional, de nº. 36/2017.

1020

### 1021 ***2.1. Indução do diabetes***

1022 O diabetes foi induzido pela administração intraperitoneal de solução de estreptozotocina  
1023 (Sigma Chemical Co., USA) após jejum alimentar de 14 horas. A estreptozotocina foi diluída  
1024 em tampão citrato de sódio a 10 mM e pH 4,5, na dose única de 60 mg/kg de peso do animal.  
1025 Os animais não diabéticos (grupo controle) receberam da mesma forma, doses equivalentes de  
1026 solução salina e decorridos 30 minutos do tratamento todos os animais foram alimentados  
1027 normalmente (DALL'AGO et al., 2002). A confirmação do diabetes foi feita após 7 dias da  
1028 administração da estreptozotocina. Foram incluídos no estudo apenas animais que apresentaram  
1029 glicose sanguínea acima de 200 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ) (SPADELLA et  
1030 al., 2005). A glicemia de jejum dos animais foi monitorada durante o período experimental,  
1031 sendo nos dias: 0 (antes da indução), 7 (confirmação do diabetes), 15 e 30 dias após  
1032 administrações de melatonina ou insulina.

1033

### 1034 ***2.2. Tratamento com melatonina***

1035

1036 O tratamento com melatonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi realizado durante 30 dias  
1037 na água de beber. Para isso, a melatonina (10 mg/kg) foi dissolvida em etanol e diluída em  
1038 solução salina, e adicionada na água de beber. As garrafas de 700 mL eram cobertas com papel

1039 alumínio e colocadas nas gaiolas sempre no início da noite (18:00h) e retiradas na manhã  
1040 seguinte (6:00h). Durante o dia era feita restrição de água aos animais.

1041

### 1042 **2.3. Tratamento com insulina**

1043

1044 A insulina foi administrada por via subcutânea durante 30 dias, na dose de 5 U/dia, sendo  
1045 duas unidades de insulina às 10h, e três unidades restantes às 19h (PINHEIRO et al., 2011).

1046

### 1047 **2.4. Peso dos animais e dos cérebros**

1048

1049 Os animais dos grupos experimentais foram pesados diariamente durante o experimento.  
1050 Após 30 dias de tratamento os animais foram eutanasiados com hidrocloreto de cetamina (80  
1051 mg/kg) e xilazina (6 mg/kg), por via intramuscular, associado a 100 mg/kg de tiopental  
1052 intraperitoneal. Após o processo de eutanásia, os cérebros foram retirados, pesados em balança  
1053 analítica. Posteriormente fragmentos do córtex frontal foram fixados em formaldeído a 10%  
1054 tamponado, e processados para inclusão em parafina.

1055

### 1056 **2.5. Histopatologia e histoquímica**

1057

1058 Cortes contendo secções transversais do córtex frontal foram submetidos à técnica de  
1059 coloração pela Hematoxilina - Eosina (H.E.) para análise histopatológica e pelo Acido  
1060 Periódico de Schiff (PAS) para o glicogênio. Foi realizada a quantificação do teor de glicogênio  
1061 através de imagens capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony<sup>®</sup>, acoplada ao microscópio  
1062 Olympus<sup>®</sup> Bx50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para elaboração de  
1063 histograma RGB (Red-Green-Blue) (OBERHOLZER et al., 1996; LEE et al., 2001).

1064 **2.6. Morfometria**

1065

1066 Trés lâminas por animal/grupo foram avaliadas. O volume [V (ref)] do córtex frontal foi  
1067 obtido pelo método de Cavalieri (GUNDERSEN; JENSEN 1987). A estimativa da densidade  
1068 numérica dos neurônios (Nv) no córtex foi calculada usando o método descrito por Gundersen  
1069 (1986) e Villeda-Hernández et al. (2006). O total do número de neurônios (N) foi calculado por  
1070 meio da seguinte fórmula:  $N = V \text{ (ref)} - Nv$  (Korbo et al., 1990; West 1993). Na substância  
1071 branca realizou-se uma avaliação morfométrica do percentual de fibras nervosas utilizando-se  
1072 uma ocular de 10x (contendo internamente um retículo de WAIBEL com 25 pontos) (WEIBEL  
1073 et al., 1966) e objetiva de 40x, onde foram contados seis campos, todos aleatórios e em sentido  
1074 horário, levando-se em consideração apenas os pontos que incidiram sobre as fibras. No total  
1075 foram contados 150 pontos por animal totalizando 450 pontos por grupo.

1076

1077 **2.7 Imunohistoquímica (IL6, TNF- $\alpha$  e apoptose)**

1078 A expressão de citocinas inflamatórias foi determinada utilizando os anticorpos para  
1079 IL-6 e TNF $\alpha$  (Santa Cruz Biotechnology) na diluição 1:30. As lâminas foram desparafinizadas  
1080 e reidratadas em xilol e alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada através de uma solução  
1081 de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5 minutos. A peroxidase  
1082 endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol. A  
1083 reação antígeno-anticorpo inespecífica foi bloqueada através da incubação das lâminas em PBS  
1084 e albumina sérica bovina (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz  
1085 Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora.  
1086 Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por trinta minutos.  
1087 A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um precipitado marrom após aplicação  
1088 de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e contracolorados com hematoxilina. As imagens



1089 foram capturadas por meio de câmera de Vídeo Sony<sup>®</sup>, acoplada ao microscópio Olympus<sup>®</sup> Bx  
1090 50, as quais foram submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de  
1091 Histograma RGB (Red-Green-Blue) (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001).

1092 Para apoptose foi utilizado o método TUNEL (Kit Apoptag – Millipore). Os cortes foram  
1093 inicialmente desparafinados e hidratados e, logo em seguida, incubados em PBS (pH 7,4) por  
1094 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a proteinase K foi aplicada sobre as lâminas  
1095 por 15 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e incubadas em peróxido de  
1096 hidrogênio por 5 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados em PBS e  
1097 incubados em tampão equilíbrio por 60 minutos a 4°C. Depois, os cortes foram incubados em  
1098 TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. Foi aplicada a solução stop por 10 minutos em  
1099 temperatura ambiente, em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e incubadas em anti-  
1100 digoxigenina. As lâminas foram enxaguadas em PBS e os cortes revelados com substrato  
1101 cromogênico diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation<sup>™</sup>) ( $\pm 20$  minutos), sendo  
1102 contracolorados com hematoxilina por 20 a 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas  
1103 em água corrente, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e colocadas em xilol para  
1104 serem montadas e observadas em microscópio de luz. O índice apoptótico foi determinado pela  
1105 contagem da porcentagem de células positivas a partir de, pelo menos 500 núcleos subdivididos  
1106 em 10 campos escolhidos aleatoriamente utilizando-se a objetiva de 40X (WU et al., 2013).

1107

## 1108 ***2.8. Análise estatística***

1109 Para análise estatística da quantificação do glicogênio, morfometria, peso dos animais,  
1110 peso do cérebro, índice apoptótico, e da expressão do TNF $\alpha$  e IL-6 foi utilizado o método não  
1111 paramétrico de Kruskal-Wallis com post-hoc de Dunn (P<0,05).

1112

### 1113 3. RESULTADOS:

1114

#### 1115 *3.1 Níveis glicêmicos*

1116

1117 Antes do processo de indução ao diabetes, todos os animais dos grupos experimentais  
1118 apresentaram níveis de glicose sanguínea abaixo de 120 mg/dL, não apresentando diferenças  
1119 significativas. Aos 7 dias todos os grupos, com exceção do controle, apresentaram glicemia  
1120 acima de 300 mg/dL. Após 15 e 30 dias do tratamento, apenas os animais do grupo diabético  
1121 (GD) continuaram a apresentar a média de glicose bastante elevada (474 mg/dL), enquanto que  
1122 os grupos tratados com insulina (GDI), melatonina (GDM) e melatonina/insulina (GDMI)  
1123 exibiram valores de glicose estatisticamente semelhante ao grupo controle (GC) (Tabela 1).

1124

#### 1125 *3.2 Peso dos animais e dos cérebros*

1126

1127 Houve perda progressiva de peso nos animais do grupo GD em relação ao controle e aos  
1128 demais grupos. Os grupos tratados (GDI, GDM e GDMI) também apresentaram redução de  
1129 peso quando comparados ao controle, porém sem apresentarem diferenças significativas entre  
1130 eles (Tabela 2). Na análise do peso dos cérebros dos grupos experimentais, o grupo GD  
1131 apresentou diferença significativa em relação aos demais grupos, evidenciando um menor valor.  
1132 Os grupos tratados com insulina (GDI), melatonina (GDM) e com melatonina/insulina (GDMI)  
1133 não apresentaram diferenças relevantes em relação ao grupo GC (Fig. 1).

1134

#### 1135 *3.3. Histopatologia e histoquímica*

1136 Na região cortical não foram observados alterações histopatológicas como degeneração  
1137 ou atrofia ou vacuolização neuronal. Entretanto, na substancia branca verificou-se um número

1138 significativo de regiões apresentando várias fibras nervosas desprovidas de axônio nos animais  
1139 do grupo GD (Fig. 2). A análise histoquímica pelo PAS revelou redução significativa do  
1140 glicogênio no córtex dos animais do grupo GD em relação aos demais grupos. Os animais dos  
1141 grupos tratados com melatonina associado ou não a insulina apresentaram características  
1142 semelhantes às observadas nos animais do controle (Fig. 3).

1143

#### 1144 **3.4. Morfometria**

1145

1146 A quantificação de neurônios no córtex frontal do cérebro dos animais dos grupos  
1147 experimentais revelou redução significativa nos animais do grupo GD em relação aos demais  
1148 grupos. Não houve diferenças significativas entre o grupo GC e os tratados com melatonina  
1149 associada ou não a insulina (Fig. 4).

1150

#### 1151 **3.5 Imunohistoquímica (IL-6, TN- $\alpha$ e apoptose)**

1152

1153 A imunohistoquímica para IL-6 revelou que os animais do grupo diabético (GD)  
1154 apresentaram uma forte marcação no córtex cerebral (Fig. 5B) Entretanto, no grupo controle  
1155 (GC) (Fig. 5A), tratado com insulina (GDI) (Fig. 5C), melatonina (GDM) (Fig. 5D) e com  
1156 melatonina/insulina (GDMI) (Fig. 5E) evidenciou-se uma marcação similar, não apresentando  
1157 diferença significativa entre esses grupos (Fig. 5F). Para o TNF- $\alpha$  o grupo controle (GC) (Fig.  
1158 6A), tratado com insulina (GDI) (Fig. 6C), com melatonina (GDM) (Fig. 6D), e com  
1159 melatonina/insulina (GDMI) (Fig. 6E) tiveram uma marcação equivalente, não apresentando  
1160 diferença significativa. Por outro lado, o grupo diabético (GD) (Fig. 6B) apresentou uma forte  
1161 marcação na região cortical, diferindo significativamente dos demais grupos (Fig. 6F).

1162 O teste TUNEL revelou um alto índice de apoptose do córtex cerebral dos animais do  
1163 grupo GD quando comparados aos animais dos demais grupos (Fig. 6).

1164

#### 1165 **4. DISCUSSÃO**

1166

1167 Em relação aos valores glicêmicos, estudos indicam que a melatonina não reduz valores  
1168 hiperglicêmicos em estado de diabetes (CAM et al., 2003). Entretanto, pesquisas realizadas em  
1169 modelos experimentais sugerem que exista uma relação positiva entre a melatonina e a insulina.  
1170 Sartori et al. (2009) mostraram que a melatonina aumentou a sensibilidade à insulina, além de  
1171 estimular a secreção deste hormônio. Isto corrobora com nossos achados em que os animais do  
1172 grupo tratado com melatonina e insulina apresentaram valores de glicose semelhantes aos do  
1173 grupo controle.

1174 Sabe-se que a perda de massa muscular é uma característica do estado diabético. Acredita-  
1175 se que esta seja resultante de uma alteração no metabolismo de proteínas no estado de  
1176 hiperglicemia, no qual este pode ser caracterizado por um aumento no catabolismo de proteínas  
1177 e gorduras, levando a uma diminuição da massa corporal dos animais (LUCIANO ; MELLO,  
1178 1999; MOURA et al., 2012), o que pode justificar os resultados observados nos animais do  
1179 grupo diabético. Por outro lado, os animais dos grupos tratados com insulina associada ou não  
1180 a melatonina também demonstraram perda de peso em relação aos animais do grupo controle,  
1181 porém com menor intensidade que os do grupo diabético. Isso demonstra que tanto a insulina  
1182 como a melatonina podem regular o peso corpóreo através do balanço energético, no qual toda  
1183 energia captada pela alimentação é utilizada e armazenada como estoque energético (SBEM,  
1184 2017).

1185 Sabe-se que o cérebro é extremamente dependente da glicose, e pode ser danificado por  
1186 anormalidades induzidas pela hiperglicemia (BLURTON-JONESA et al., 2009, YAMADA et

1187 al, 2002). Isso ocorre porque os distúrbios do transporte neuronal de glicose e do metabolismo  
1188 na hiperglicemia podem induzir a produção de uma quantidade aumentada de radicais livres em  
1189 condição diabética e subsequentemente afetar negativamente a produção do fator neurotrófico  
1190 derivado do cérebro (BDNF). O BDNF desempenha um papel importante na sobrevivência dos  
1191 neurônios, no seu crescimento (axônios e dendritos), e na formação e função das sinapses  
1192 (YAMADA et al, 2002; BLURTON-JONESA et al, 2009). Isso poderia explicar a degeneração  
1193 do axônio na substância branca e redução dos teores de glicogênio no córtex dos animais  
1194 diabéticos, o que foi prevenido nos animais tratados com melatonina independente da  
1195 associação com a insulina, provavelmente pela capacidade dessa idolamina promover a  
1196 expressão do BDNF (LUO et al., 2017). Com relação a insulina, Ghasemi et al. (2013) relataram  
1197 a presença de maior quantidades de receptores desse hormônio em vários locais como o bulbo  
1198 olfativo, córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e plexo coroide, sugerindo sua importancia na  
1199 sobrevivência neuronal, na plasticidade sináptica e na absorção da glicose (BANKS, 2004).

1200 A análise morfometria revelou redução do número de neurônios no córtex frontal dos  
1201 animais do grupo diabético sem tratamento. Isso sem dúvida está relacionado ao alto índice  
1202 apoptótico observado nesses animais, justificando também a redução do peso do cérebro em  
1203 relação aos animais dos demais grupos. A apoptose é uma série de processos programados para  
1204 a execução da morte celular, e desempenha um papel significativo na manutenção da  
1205 homeostase dos tecidos. Quando desregulado, este processo é associado a diversos estados  
1206 patológicos como doenças neurodegenerativas e diabetes mellitus (LEE; PERVAIZ, 2007;  
1207 DOSERMANS et al., 2017).

1208 Em estudos relacionados com o sistema nervoso central, a administração de melatonina  
1209 exógena resultou em uma diminuição de células TUNEL-positivas, indicando o efeito neuro-  
1210 protetor deste hormônio e sugerindo que a melatonina poderia atuar na prevenção de doenças  
1211 neurodegenerativas através da inibição da via intrínseca da apoptose (LIMA et al., 2005;

1212 TUZCU; BAYDAS, 2006; FERREIRA et al., 2010; BRAZ, 2015 ). No que se refere a insulina,  
1213 esta é capaz de inibir a apoptose em situações de estresse oxidativo, isquemia e toxicidade do  
1214 peptídeo  $\beta$ -amilóide (GHASEMI et al., 2013; BRAZ 2015).

1215 As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel fundamental na patogênese do  
1216 diabetes (GOSH et al., 2015). Nossos resultados mostraram que houve uma forte marcação da  
1217 IL-6 e do TNF- $\alpha$  na área cortical do cérebro dos animais do grupo diabético em relação aos  
1218 animais dos demais grupos. Isso estabelece a presença de um processo de neurodegeneração o  
1219 que pode levar a complicações cerebrais (WAJANT et al., 2003; NEGI et al., (2010);  
1220 CUTANDO et al., 2015). No entanto, esses efeitos foram prevenidos pela melatonina associada  
1221 ou não a insulina, certamente pelo fato desse hormônio ser um potente inibido de interleucinas  
1222 inflamatórias (KUMAR; SHARMA, 2010; SERAPHIM et al., 2010). Além disso, estudos  
1223 comprovam a ligação da insulina com a regulação da resposta inflamatória, uma vez que este  
1224 hormônio participa de processos que inibem a produção de citocinas inflamatórias como IL-6  
1225 e TNF- $\alpha$  (BRAZ et al., 2015).

1226 Diante dos resultados, pode-se concluir que o tratamento com melatonina associada ou  
1227 não a insulina se mostrou benéfico para prevenir os efeitos do diabetes no córtex frontal do  
1228 cérebro de ratos. Entretanto, a importância clínica e fisiológica dessa administração exige mais  
1229 esclarecimentos para melhor compreensão dos mecanismos pelo qual a melatonina exerce esses  
1230 efeitos benéficos.

1231

## 1232 **5. REFERÊNCIAS**

1233 AHMADPOUR, S. H.; HAGHIR, H. Diabetes mellitus type 1 induces dark neuron formation  
1234 in the dentate gyrus: a study by Gallyas' method and transmission electron microscopy. Rom.  
1235 J. Morphol. Embryol. v. 52, n. 2, p. 575-579, 2011.

- 1236 BANKS, W. A. The source of cerebral insulin. *Eur. J. Pharmacol.* v. 490, n. 3, p. 5-12, 2004.
- 1237 BEAUQUIS, J.; ROIG, P.; HOMO-DELARCHE, F.; DE-NICOLA, A.; SARAIVA, F.  
1238 Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced  
1239 diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur. J. Neurosci.* v. 23, n. 6, p. 1539-46,  
1240 2006.
- 1241 BAYDAS, G.; ERÇEL, E.; CANATAN, H.; DONDER, E.; AKYOL, A. Effect of melatonin  
1242 on oxidative status of rat brain, liver and kidney tissues under constant light exposure. *Cell.*  
1243 *Biochem. Funct.* v. 19, p. 37-41, 2001.
- 1244 BLURTON-JONES, M.; KITAZAWA, M.; MARTINEZ-CORIA, H.; CASTELLO, N.  
1245 A.; MALLERB, F.; LORING, J. F.; YAMASAKIA, T. R. POONA, W. W.; GREENA, K. N.;  
1246 LAFERLA, F. M. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of  
1247 Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 32, p. 13594-13599, 2009.
- 1248 CAM, M.; YAVUZ, O.; GUVEN, A.; ERCAN, F.; BUKAN, N.; USTÜNDAG, N. Protective  
1249 effects of chronic melatonin treatment against renal injury in streptozotocin-induced diabetic  
1250 rats. *J. Pineal Res.*, v. 35, p. 212-220, 2003.
- 1251 CUTANDO, A.; MONTERO, J.; GOMEZ-DE-DIEGO, R.; FERRERA, M. J.; LOPEZ-  
1252 VALVERDE, A. Effect of topical application of melatonin on serum levels of C-reactive  
1253 protein (CRP), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in patients with  
1254 type 1 or type 2 diabetes and periodontal disease. *J. Clin. Exp. Dent.* v. 5, p. 1-7, 2015.
- 1255 DALL'AGO, P.; SILVA, V. O.; DE-ANGELIS, K. L.; IRIGOYEN, M. C.; FAZAN, R. J.;  
1256 SALGADO, H. C. Reflex control of arterial pressure and heart rate in short-term streptozotocin  
1257 diabetic rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v. 7, n. 35, p. 843-849, 2002.

- 1258 DORSEMANS, A. C.; COURET, D.; HOARAU, A; MEIHAC, O.; LEFEBVRE, D. C.;
- 1259 DIOTEL, N. Diabetes, adult neurogenesis and brain remodeling: New insights from rodent and
- 1260 zebrafish models. *Neurogenesis*. v. 1, p. 31-4, 2017.
- 1261 EDWARD, J. L.; VICENT, A. M.; CHENG, H. T.; FELDMAN, E. L. Diabetic neuropathy:
- 1262 Mechanisms to management. *Pharmacol. Ther.* v. 120, p. 1-34, 2008.
- 1263 EL-SOKKARY, G. H.; KAMEL, E. S.; REITER, R. J. Prophylactic effect of melatonin in
- 1264 reducing lead-induced neurotoxicity in the rat. *Cell. Mol. Biol. Lett.* v. 8, p. 461-470, 2003.
- 1265 FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.; GIRÃO, M. J. B. C.; BARACAT, E.
- 1266 C.; SOARES-JR, J. M. Melatonina: modulador de morte celular. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v. 56,
- 1267 n. 6, p. 715-718, 2010.
- 1268 FRANC, D. T.; KODL, C. T.; MUELLER, B. A.; MUETZEL, R. L.; LIM, K. O.; SEAQUIST,
- 1269 E. R. High connectivity between reduced cortical thickness and disrupted white matter tracts in
- 1270 long-standing type 1 diabetes. *Diabetes*. v. 60, p. 315–319, 2011.
- 1271 FRANCIS, G. J.; MARTINEZ, J. A.; LIU, W. Q.; XU, K.; AYER, A.; FINE, J.; TUOR, U. I.;
- 1272 GLAZNER, G.; HANSON, L. R.; FREY, I. I. W. H.; TOTH, C. Intranasal insulin prevents
- 1273 cognitive decline, cerebral atrophy and whitematter changes in murine type I diabetic
- 1274 encephalopathy. v. 131, p. 3311-3334, 2008.
- 1275 GHOSH, S.; BANERJEE, S.; PARAMES, P. The beneficial role of curcumin on inflammation,
- 1276 diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem. Toxicol.* v. 6, 2015.
- 1277 GHASEMI, R.; HAERI, A.; DARGAHI, L.; MOHAMED, Z.; AHMADIANI, A. Insulin in the
- 1278 brain: sources, localization and functions. *Mol. Neurobiol.* v. 47, p. 145-71, 2013.



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

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

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

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

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

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

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

- 1323 MAZEPA, R. C.; CUEVAS, M. J.; COLLADO, P. S. ; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Melatonin  
1324 increases muscle and liver glycogen content in nonexercised and exercised rats. *Life Sci.* v.  
1325 66, n. 2, p. 153, 2000.
- 1326 MOURA, L. P.; GOMES, R. J.; LEME, J. A.; VOLTARELLI, F. A.; RIBEIRO, C.; MOURA,  
1327 R. F.; ARAÚJO, M. B.; LUCIANO, E.; MELLO, M. R. Insulina pancreática de ratos diabéticos  
1328 tipo 1 submetidos a um protocolo de treinamento físico individualizado. *Motricidade.* v. 8, p.  
1329 23-2, 2012.
- 1330 PINHEIRO, L.; MELO, A. D.; ANDREAZZI, A. E.; GONZALEZ-GARCIA, R. M. Protocol  
1331 of Insulin Therapy For Streptozotocin-Diabetic Rats Based on a Study of Food Ingestion and  
1332 Glycemic Variation. *Scandinavian J. Lab. Animal Sci.* v.38, n.2, 2011.
- 1333 PIOTROWSKI, P.; WIERZBICKA, K.; SMIALEK, M. Neuronal death in the rat hippocampus  
1334 in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants. *Folia Neuropathol.*  
1335 v. 39, n. 3, p. 147-54, 2001.
- 1336 SARTORI, C.; DESSEN, P.; MATHIEU, C.; MONNEY, A.; BLOCH, J.; NICOD, P.;  
1337 SCHERRER, U.; DUPLAIN, H. Melatonin Improves Glucose Homeostasis and Endothelial  
1338 Vascular Function in High-Fat Diet-Fed Insulin-Resistant Mice. *Endocrinology.* v. 150, n. 12,  
1339 p. 311-7, 2009.
- 1340 SERAPHIM, P. M.; SUMIDA, D. H.; NISHIDE, F. T. A glândula pineal e o metabolismo de  
1341 carboidratos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v. 44, n. 4, p. 331-338, 2000.
- 1342 SICKMANN, M.; WAAGEPETERSEN, H. S.; SCHOUSBOE, A.; BENIE, A. J.; BOUMAN,  
1343 S. D. Brain glycogen and its role in supporting glutamate and GABA homeostasis in a type 2  
1344 diabetes rat model. *Neurochem. Int.* v. 60, p. 267-275, 2012.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1386

1387

1388

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

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

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

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

1392

1393

1394

1395

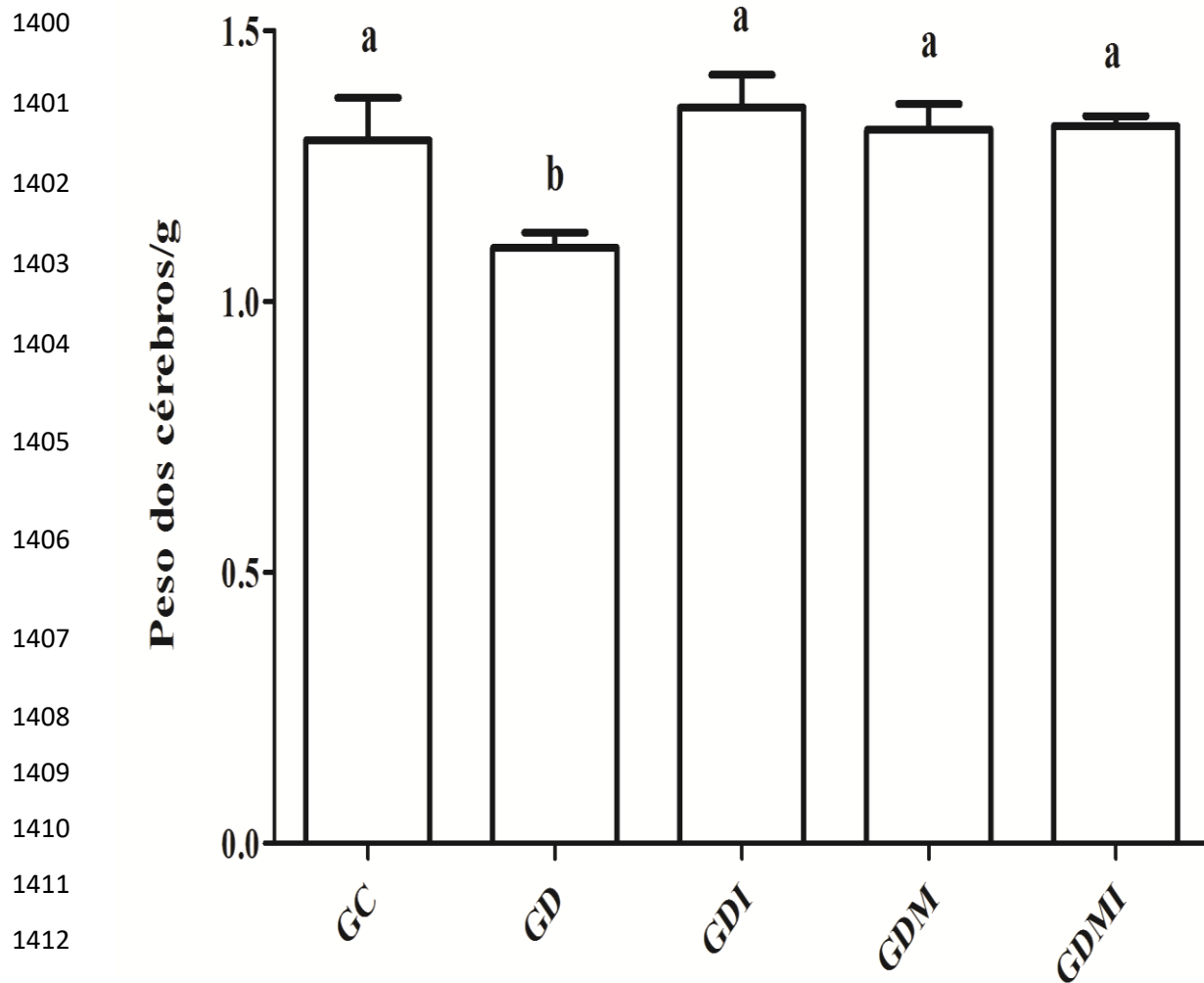
1396 Tabela 2: Peso dos animais dos grupos experimentais.

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

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

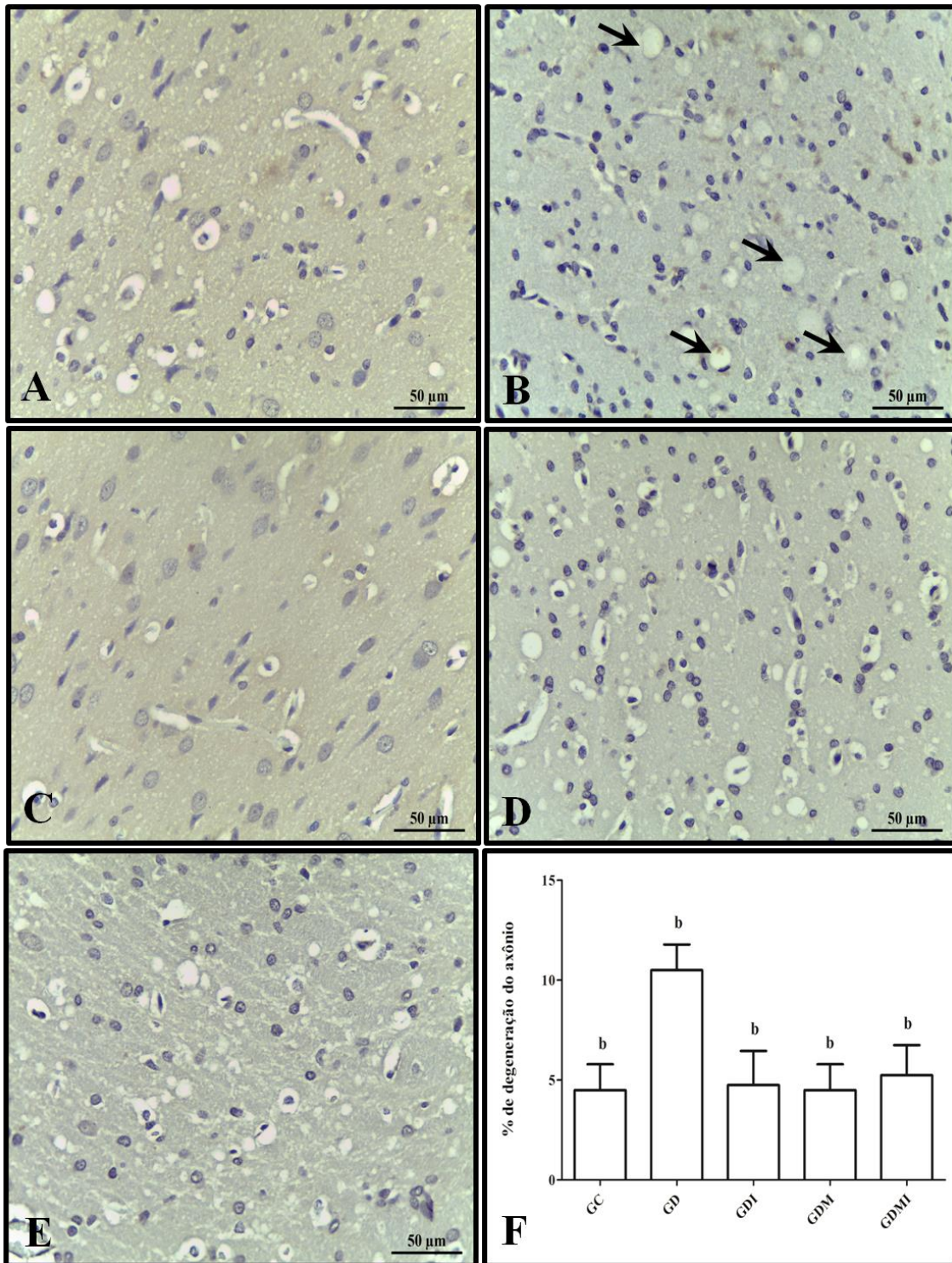
1398

1399



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

1426  
1427  
1428  
1429  
1430  
1431  
1432  
1433  
1434  
1435  
1436  
1437  
1438  
1439  
1440  
1441  
1442  
1443  
1444  
1445



1446 **Figura 2.** Fotomicrografia da substância branca do cérebro dos animais dos grupos  
1447 experimentais. A (GC); B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Percentual de fibras  
1448 nervosas sem axônio. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre  
1449 si pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). H.E. Setas - fibras nervosas sem axônio.



1450

1451

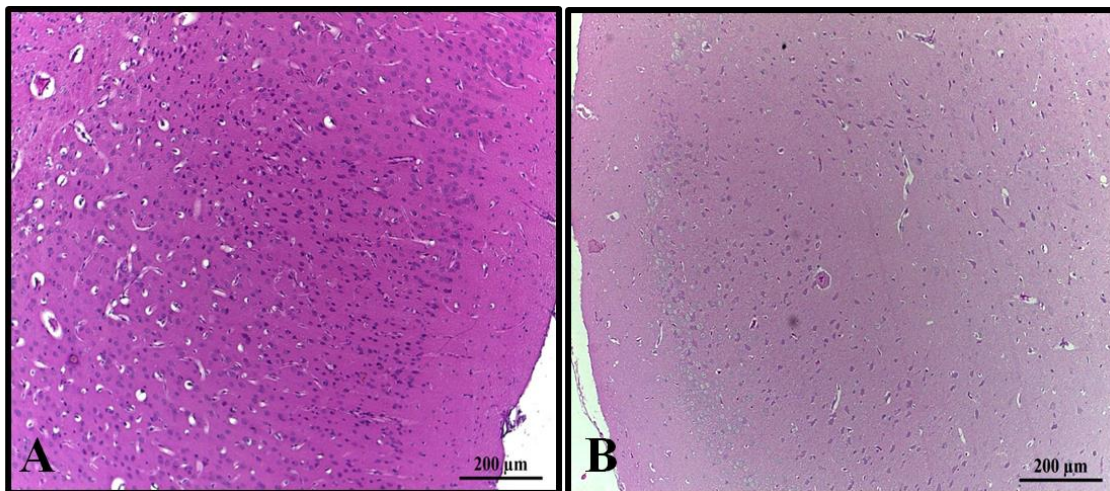
1452

1453

1454

1455

1456



1457

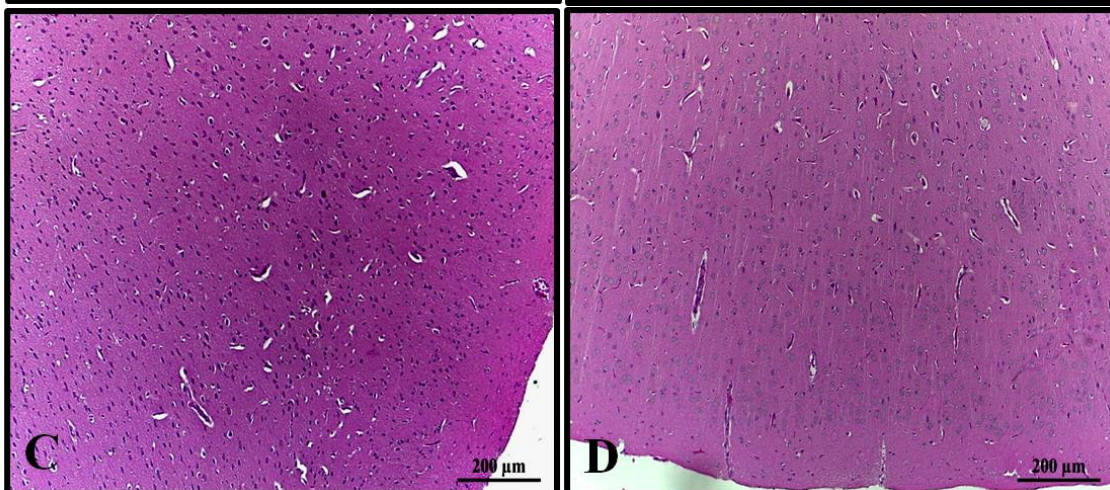
1458

1459

1460

1461

1462



1463

1464

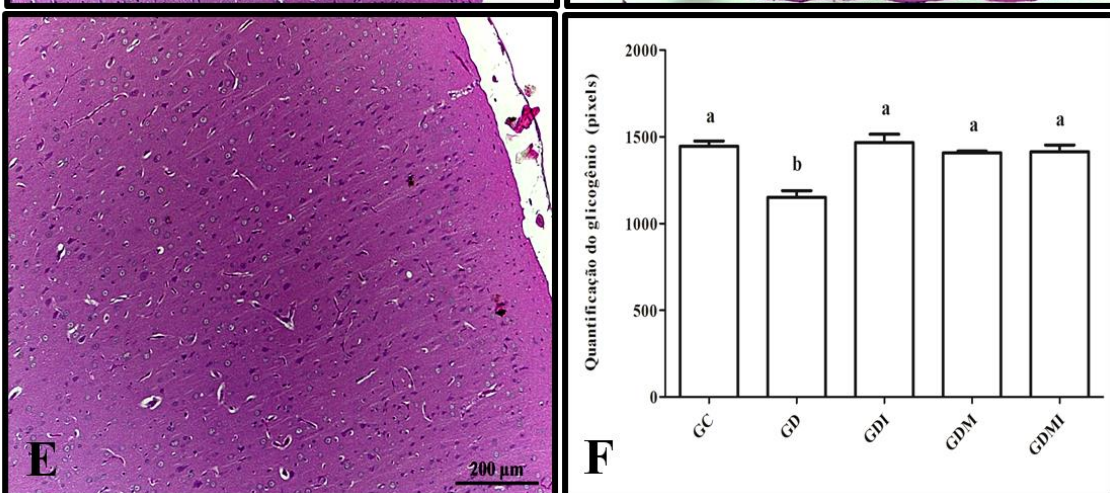
1465

1466

1467

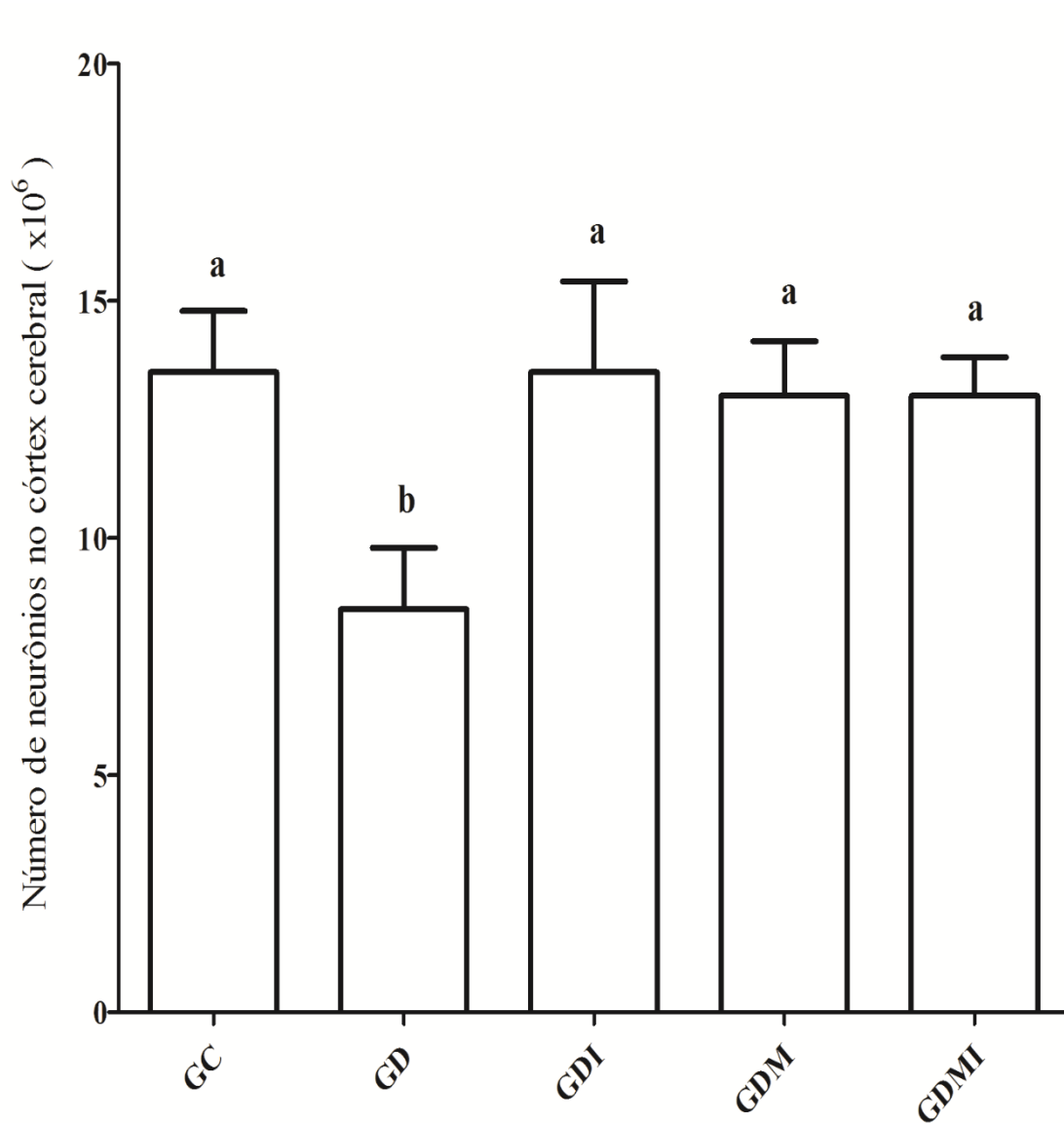
1468

1469



1470

1471 **Figura 3.** Fotomicrografia do córtex cerebral dos animais dos grupos experimentais. A (GC);  
1472 B (GD); C (GDI); D (GDM) e E (GDMI). F – Quantificação em pixels do teor de glicogênio.  
1473 Notar redução significativa no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não diferem  
1474 significativamente entre si pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). PAS.



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



1500

1501

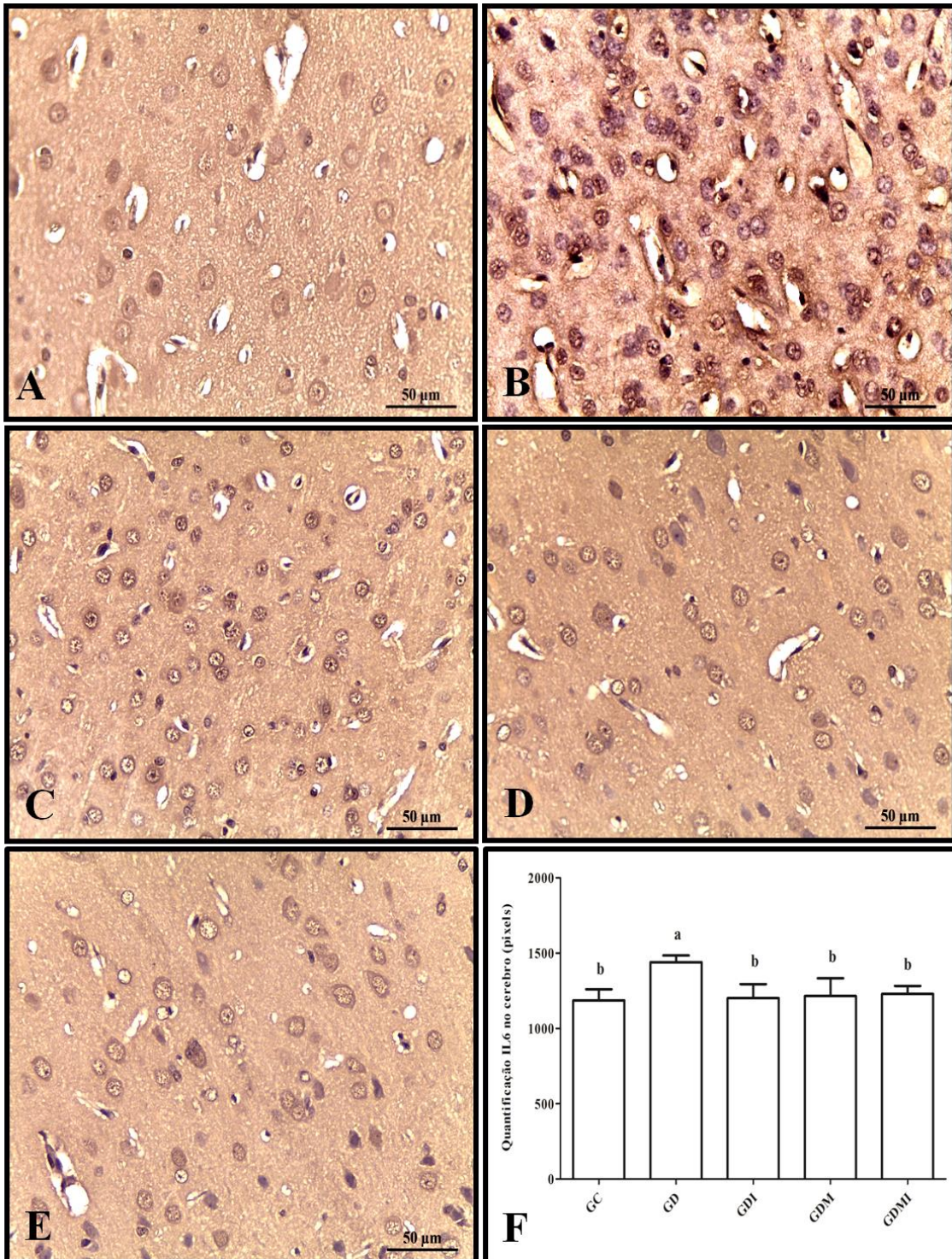
1502

1503

1504

1505

1506



1513

1514

1515

1516

1517

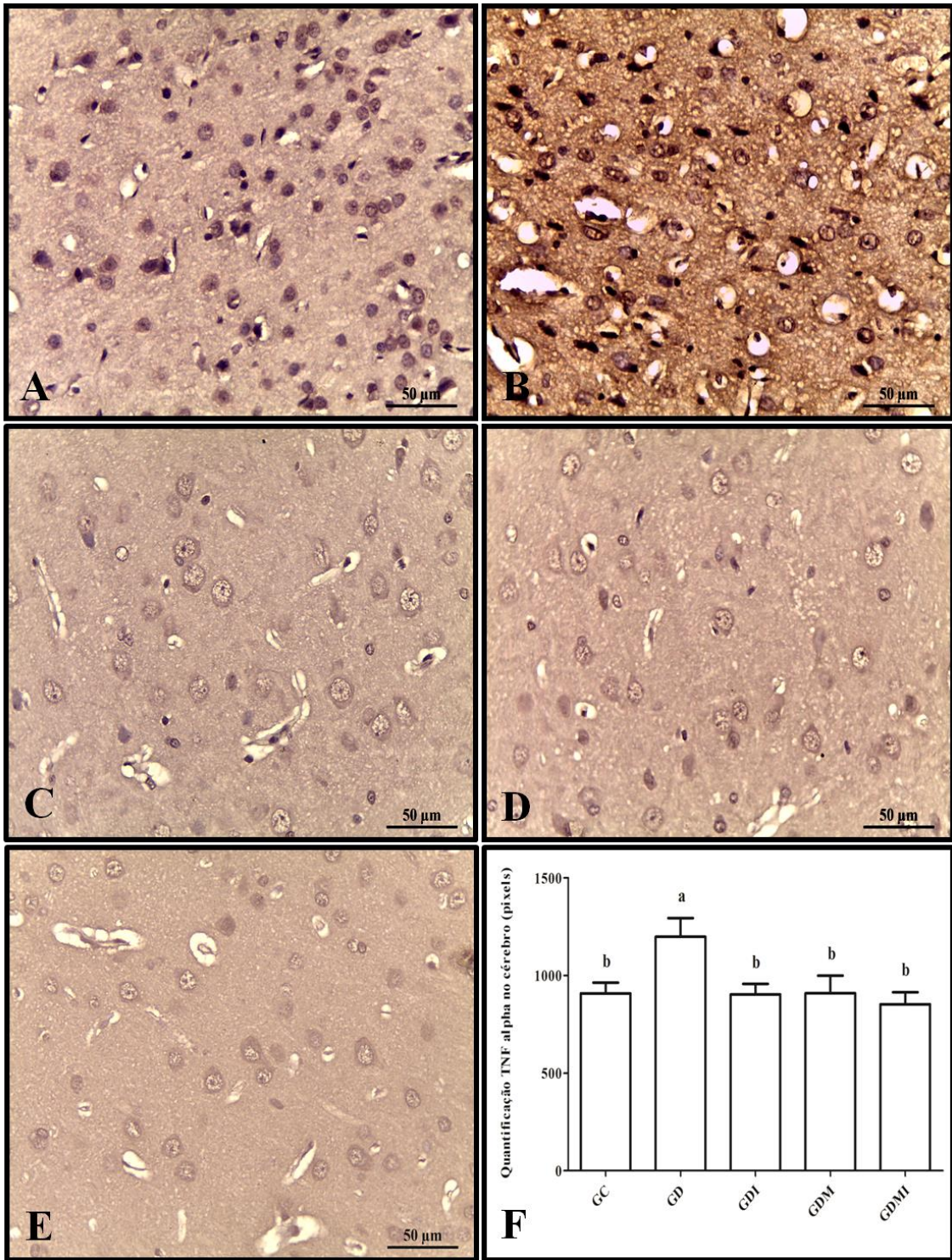
1518

1519 **Figura 5.** Imunohistoquímica para IL-6 no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM)  
1520 e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação  
1521 em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não  
1522 diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).

1523



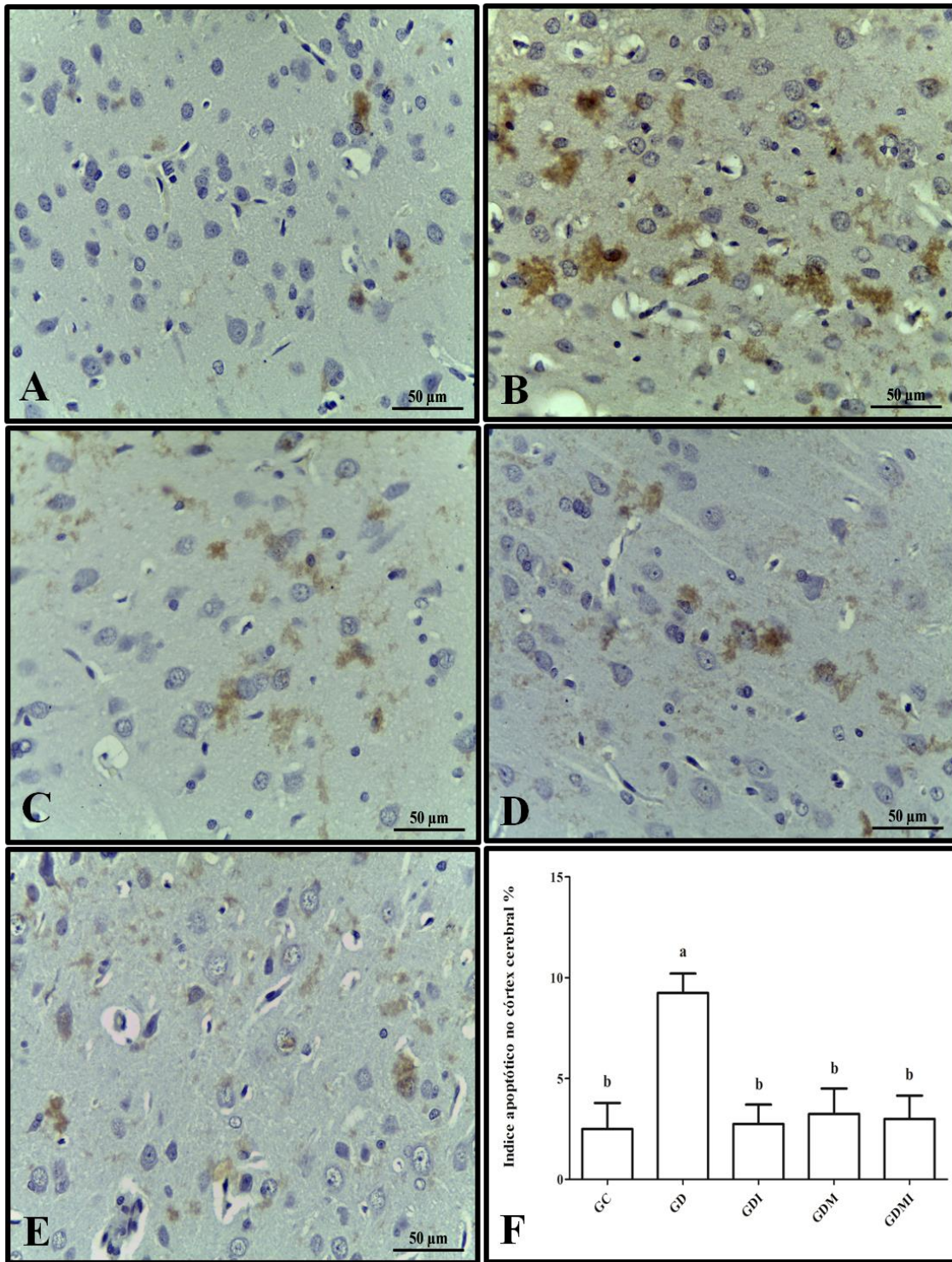
1524  
1525  
1526  
1527  
1528  
1529  
1530  
1531  
1532  
1533  
1534  
1535  
1536  
1537  
1538  
1539  
1540  
1541  
1542



1543 **Figura 6.** Imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D (GDM)  
1544 e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Quantificação  
1545 em pixels. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não  
1546 diferem significativamente entre si pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ).



1547  
1548  
1549  
1550  
1551  
1552  
1553  
1554  
1555  
1556  
1557  
1558  
1559  
1560  
1561  
1562  
1563  
1564  
1565



1566 **Figura 7.** Imunohistoquímica para apoptose no cérebro. Observar em A (GC), C (GDI), D  
1567 (GDM) e E (GDMI) fraca marcação, e em B (GD) forte marcação na camada cortical. F - Índice  
1568 apoptótico. Notar aumento significativo no grupo GD. Médias seguidas pela mesma letra não  
1569 diferem significativamente entre si pelo teste de Dunrtn ( $p < 0,05$ ).

1570