



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS NOS
RINS DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS, AOS 30 E 60 DIAS DE VIDA**

JOSÉ JAMESSON DOMINGOS DE SOUSA

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Valeria Wanderley Teixeira

Recife, 2023

JOSÉ JAMESSON DOMINGOS DE SOUSA

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS NOS
RINS DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS, AOS 30 E 60 DIAS DE VIDA**

**Apresentação de Monografia para
a obtenção do Título de
Licenciado em Ciências
Biológicas pela Universidade
Federal Rural de Pernambuco.**

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Valeria Wanderley Teixeira

**RECIFE – PE
Setembro, 2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725a Sousa, José Jamesson Domingos de
AÇÃO DA MELATONINA SOBRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS NOS RINS DA PROLE DE
RATAS DIABÉTICAS, AOS 30 E 60 DIAS DE VIDA / José Jamesson Domingos de Sousa. - 2023.
34 f. : il.

Orientador: Alvaro Aguiar Coelho Teixeira.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Licenciatura em Ciências Biológicas, Recife, 2023.

1. Diabetes. 2. Glicotoxicidade. 3. Ratos. 4. Prole. I. Teixeira, Alvaro Aguiar Coelho, orient. II. Título

CDD 574

**AÇÃO DA MELATONINA SOBRE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATORIAS NOS
RINS DA PROLE DE RATAS DIABÉTICAS, AOS 30 E 60 DIAS DE VIDA**

JOSÉ JAMESSON DOMINGOS DE SOUSA

Orientador: _____

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

1º Examinador: _____

Dr. Clovis José Cavalcanti Lapa Neto - UFRPE

2º Examinador: _____

MSc. Bruno José do Nascimento - UFRPE

Suplente: _____

MSc. Maria Vanessa da Silva - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a DEUS que me permitiu chegar até aqui, porque como dizem as escrituras “Porque dele, e por ele, e para ele são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém!” carta aos Romanos 11 e versículo 36, e a DEUS a glória e a honra e o louvor em primeiro lugar. Sou grato pela saúde, força e capacidade que Ele tem me dado.

Agradeço a minha esposa Islâne, por ser minha companheira e acreditar nos meus sonhos e além disso sonhar junto comigo. Nesses últimos 10 anos tem batalhado comigo e acreditado em mim, estou grato pelo seu amor pois quando começamos eu não tinha nada além do amor pra oferecer e juntos construímos o que temos hoje e sem ela eu não seria quem sou. Grato pela paciência, por acreditar, e por tantas vezes que impulsionou, pelas batalhas que lutamos juntos e pelas vitórias que são nossas, você é minha principal inspiração e motivação. Obrigado.

Agradeço aos meus pais, minha mãe Simone que tanto me ensinou e cuidou de mim em todo esse tempo, tenho orgulho e inspiração pois ela é uma guerreira e me ensinou a ter o caráter, o respeito, me ofereceu o colo quando necessário e tive bons conselhos. Ao meu pai Sandoval pelo investimento e cuidado, pela preocupação em todo esse tempo de me conceder as possibilidades que ele não teve, e se hoje pude estudar e me formar é também porque ele sujou as mãos com o trabalho e me sustentou para que eu pudesse ir até o fim. Eles são meu modelo e inspiração e eu sou grato e devo tudo isso a eles. Agradeço a minha irmã Jamily que de modo impetuoso e em todos momentos busca ajudar a me aperfeiçoar e a vencer as batalhas.

Agradeço aos professores Álvaro e Valéria que me abriram as portas do laboratório em meio a tantos alunos e com pouco tempo me permitiram mergulhar na imensidão que são os estudos e aprofundar o meu conhecimento através desse projeto. Mesmo sendo um aluno inexperiente tiveram paciência e tornaram possível isso hoje.

Agradeço a Bruno, Vanessa, Yasmim, Marcelle, Antony e Érique que o tempo todo me ajudaram e me ensinaram os procedimentos que tornaram esse trabalho possível.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de jornada Felipe, Daniel, Alef, Pedro, Jhonatan, Amanda, Cibelle. Pessoas que vou levar pra vida toda, gente que estava lá nos momentos difíceis e de necessidade, e que me proporcionaram também as melhores experiências em toda graduação.

Agradeço aos meus irmãos e irmãs de fé que tem orado por mim todo esse tempo, e tanto tem me abençoado. Sou muito grato a minha igreja e comunidade de fé.

E por fim agradeço a UFRPE por todo curso de biologia e pela formação que foi possível atingir aqui.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos filhotes dos grupos experimentais, aos 30 dias de vida-----pg.26

Tabela 2. Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos filhotes dos grupos experimentais, aos 60 dias de vida-----pg.26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunohistoquímica para o IL-6 nos rins dos filhotes dos grupos experimentais aos 30 (A, B e C) e 60 (D, E e F) dias de vida. A e D (GC), B e E (GD), C e F (GDM). Verificar marcação em todos os grupos, sendo mais expressiva no grupo GD (B e E)-----pg.23

Figura 2. Imunohistoquímica para o TNF α nos rins dos filhotes dos grupos experimentais aos 30 (A, B e C) e 60 (D, E e F) dias de vida. A e D (GC), B e E (GD), C e F (GDM). Verificar marcação em todos os grupos, sendo mais expressiva no grupo GD (B e E)-----pg.24

Figura 3: Quantificação do IL6 em pixels. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer ($p < 0,05$)-----pg.25

Figura 4: Quantificação do TNF α em pixels. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer ($p < 0,05$)-----pg.25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1. Diabetes mellitus	11
2.2. Diabetes gestacional	13
2.3. Rins	14
2.4. Citocinas.....	15
2.5. Melatonina	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. METODOLOGIA.....	17
4.1. Acasalamento dos animais e diagnóstico da prenhez.....	18
4.2. Indução do Diabetes Gestacional.....	18
4.3. Tratamento com Melatonina	19
4.4. Microscopia de Luz.....	19
4.5. Análise imunohistoquímica	20
4.6. Análise morfométrica.....	20
4.7. Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS	22
5.1. Imunohistoquímica	22
5.2. Análise morfométrica.....	22
6. DISCUSSÃO.....	27
7. CONCLUSÃO	28
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1 RESUMO

2 O diabetes gestacional é uma doença que acomete mulheres grávidas e pode
3 afetar a prole, promovendo efeitos inflamatórios em seus órgãos. Sendo assim o
4 objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da melatonina sobre citocinas pró-
5 inflamatórias nos rins da prole de ratas diabéticas, aos 30 e 60 dias de vida. Para
6 isto foram utilizadas 15 ratas albinas, com 90 dias de idade, divididas em 3 grupos:
7 Grupo controle (GC), grupo diabetes (GD), grupo diabetes melatonina (GDM). As
8 ratas foram induzidas ao diabetes durante a gestação através da estreptozotocina
9 com uma única dose de 60 mg/Kg, por meio administração intraperitoneal. Após
10 indução do diabetes foi administrado melatonina em injeções diárias de 0,8 mg/Kg,
11 durante a gestação no GDM. Foram feitas análises morfométricas e
12 imunoistoquímicas para TNF α e IL-6 dos rins dos filhotes. Como resultados houve
13 marcações para as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α em todos animais. A
14 análise da quantificação dessas citocinas revelou uma maior expressão nos rins
15 dos filhotes do grupo GD, diferindo significativamente dos demais grupos, que não
16 diferiram entre si. A análise morfométrica dos rins revelou que os animais do grupo
17 GD apresentaram aumento do diâmetro e volume glomerular, e do diâmetro e
18 volume da cápsula de Bowman, diferindo significativamente dos demais grupos.
19 Com isso pode concluir-se que o uso da melatonina resultou em efeito positivo
20 sobre a prole pois conseguiu manter os níveis normais de citocinas nos rins o que
21 por sua vez mostra que pode conter o efeito inflamatório da diabetes.

22 **Palavras-chave:** Glicotoxicidade, Diabetes, Citocinas, Melatonina, Gestação.

23

24 ABSTRACT

25 Gestational diabetes is a disease that affects pregnant women and can affect
26 their offspring, promoting inflammatory effects on their organs. Therefore, the
27 objective of this work was to evaluate the action of melatonin on pro-inflammatory
28 cytokines in the kidneys of the offspring of diabetic rats, at 30 and 60 days of life.
29 For this, 15 albino rats, 90 days old, were used, divided into 3 groups: Control group
30 (CG), diabetes group (GD), diabetes melatonin group (GDM). The rats were
31 induced to develop diabetes during pregnancy using streptozotocin with a single
32 dose of 60 mg/kg, through intraperitoneal administration. After diabetes induction,
33 melatonin was administered in daily injections of 0.8 mg/kg, during pregnancy in the
34 GDM. Morphometric and immunohistochemical analyzes were performed for TNF α
35 and IL-6 in the pups' kidneys. As a result, there were stainings for the pro-
36 inflammatory cytokines IL-6 and TNF α in all animals. The analysis of the
37 quantification of these cytokines revealed a higher expression in the kidneys of the
38 puppies in the GD group, differing significantly from the other groups, which did not
39 differ from each other. The morphometric analysis of the kidneys revealed that the
40 animals in the GD group showed an increase in glomerular diameter and volume,
41 and in the diameter and volume of Bowman's capsule, significantly differing from
42 the other groups. Therefore, it can be concluded that the use of melatonin resulted
43 in a positive effect on the offspring as it managed to maintain normal levels of
44 cytokines in the kidneys, which in turn shows that it can contain the inflammatory
45 effect of diabetes.

46

47 **Keywords:** Glycotoxicity, Diabetes, Cytokines, Melatonin, Pregnancy.

48 1. INTRODUÇÃO

49 O diabetes mellitus é uma doença metabólica que afeta a homeostase do
50 metabolismo de glicose, isso porque portadores da doença sofrem com falta ou
51 ineficácia da insulina, trazendo ao corpo um quadro de hiperglicemia. Existe mais
52 de um tipo de diabetes, porém os mais incidentes são os de tipo 1 e tipo 2. A
53 diabetes tipo 2 apresenta como característica a resistência à insulina e deficiência
54 parcial de secreção de insulina pelas células β do pâncreas, o corpo apresenta
55 uma resposta diminuída a ação da insulina gerando um aumento nos índices da
56 glicemia (DEFRONZO, 2009).

57 Além dessas, existe a diabetes gestacional, quadro que acomete mulheres
58 gestantes, que pode acontecer durante o período gestacional ou após, esse quadro
59 é consequência de ações hormonais e alguns outros fatores. A diabetes
60 gestacional também apresenta disfunção das células β e pode chegar a uma
61 resistência crônica à insulina, com isso as mulheres afetadas tem uma
62 probabilidade maior de resistência à insulina do que as mulheres grávidas
63 saudáveis (CATALANO et al., 1999). A diabetes gestacional também pode gerar
64 problemas a prole, incluindo desenvolvimento de diabetes, obesidade infantil, parto
65 prematuro, etc. (SZMUILOWICZ; JOSEFSON; METZGER, 2019).

66 Os fatores que causam a diabetes são variados entre eles estão obesidade,
67 sedentarismo, o avanço da idade, fatores genéticos hereditários, hipertensão
68 arterial, tabagismo e a contaminação por covid 19 (SHARMA et al., 2022). Os
69 efeitos da diabetes também afetam alguns órgãos do corpo principalmente o
70 pâncreas, o fígado, o coração e os rins. O quadro de hiperglicemia afeta vários
71 sistemas do corpo trazendo muitos problemas como inflamações, mudanças de pH,
72 problemas cardíacos em decorrência do estresse oxidativo causado ao corpo
73 (REAVEN, 2012).

74 O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes
75 nas células. O desequilíbrio dessa relação a favor dos pró-oxidantes pode levar a
76 danos celulares por interferir no estado de proteínas, lipídios e DNA, e tem sido
77 implicado na patogênese de muitas doenças, incluindo diabetes gestacional
78 (LAPPAS et al., 2011). Como resposta às inflamações, que são consequências do
79 estresse oxidativo causado pela diabetes nos órgãos, são liberadas citocinas como
80 resposta (CALLE; FERNANDEZ, 2012). As citocinas possuem a função de auxiliar

81 a resposta das células imunológicas e funcionam como biomarcadores para a
82 presença de inflamação (BURSKA; BOISSINOT; PONCHEL, 2014). Entre todas
83 podemos citar a IL-6 e a TNF α como citocinas pró-inflamatórias (BOSHTAM et al.,
84 2017). Dessa forma, testamos avaliamos a ação da melatonina sobre os rins da
85 prole de ratas induzidas ao diabetes durante a gestação.

86

87 **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

88 2.1. Diabetes mellitus

89 A Diabetes Mellitus é uma doença que afeta o metabolismo de açúcar no
90 sangue, isto porque o portador da doença sofre com a falta ou a ineficácia da
91 insulina trazendo ao corpo um quadro de hiperglicemia (ZACCARDI et al., 2016), a
92 diabetes pode ser causada por mais de um fator entre eles a obesidade, o
93 sedentarismo, má alimentação e fatores genéticos (WU et al., 2014).

94 Essa síndrome pode ser dividida em mais de um tipo sendo os principais o
95 tipo 1 e tipo 2. A primeira ocorre quando as células β do pâncreas são destruídas
96 por ação autoimune tornando assim o organismo insulino dependente, isso porque
97 o pâncreas vai produzir pouca insulina ou nenhuma, fazendo os índices de açúcar
98 aumentarem no sangue, o que traz a necessidade de administração exógena de
99 insulina (GILLESPIE, 2006). A diabetes tipo 2 apresenta uma resistência dos
100 tecidos periféricos a ação da insulina, e também uma resposta inadequada das
101 células β do pâncreas aos estímulos da glicose, trazendo como consequência uma
102 redução na massa de células β (GALICIA-GARCIA et al., 2020). Os portadores da
103 diabetes tipo 2 produzem quantidades normais de insulina durante o período de
104 jejum, porém, quando há um aumento na carga de glicose a quantidade de insulina
105 secretada não é suficiente para a sua metabolização (RODEN; SHULMAN, 2019),
106 dificultando a absorção de glicose pelas células (STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN
107 HAEFTEN, 2005).

108 Com o progresso da doença a insulina vai se tornando ineficaz na
109 manutenção homeostática da glicose trazendo consigo o aumento da glicemia.
110 Essa condição hiperglicêmica começa a afetar o pH sanguíneo, pois na busca pela
111 glicose o corpo faz a cetogênese que tem como substrato os corpos cetônicos que

112 se acumulam no sangue alterando o pH, com essa variação na acidez do
113 sangue os órgãos sofrem efeitos inflamatórios entre eles o rim que é responsável
114 pela filtração do sangue (CHATTERJEE; KHUNTI; DAVIES, 2017); (SCHWARTZ et
115 al., 2016).

116 Segundo a OMS a diabetes mellitus é uma doença que com o passar do
117 tempo causa danos ao coração, vasos sanguíneos, olhos, nervos e rins. Em 90%
118 dos casos de diabetes mellitus a prevalência são do tipo 2. Como característica da
119 progressão da diabetes o corpo apresenta um quadro em que a homeostase da
120 glicose é incapaz de ser mantida pela insulina (WEYER et al., 1999). Além desses
121 problemas também existe a glucotoxicidade que é o termo usado para definir os
122 efeitos deletérios da hiperglicemia crônica no organismo (MOTA et al., 2016).
123 Como consequência da diabetes os vasos sanguíneos e capilares apresentam
124 graves complicações entre elas retinopatia, neuropatia, nefropatia e doenças
125 cardiovasculares, e alterações na morfologia de alguns órgãos. Essas
126 complicações aumentam as chances de mortalidade (CHEN et al., 2022). Todos
127 esses efeitos podem ser causados pela glicotoxicidade,

128 Alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 são
129 obesidade, sedentarismo, o avanço da idade, fatores genéticos hereditários,
130 hipertensão arterial, tabagismo e a contaminação por covid-19 (FLETCHER;
131 GULANICK; LAMENDOLA, 2002).

132 A obesidade cria um quadro inflamatório no corpo afetando as células β do
133 pâncreas e aumentando a resistência do corpo a insulina, o acúmulo de gordura
134 principalmente na região abdominal estimula o aumento da produção da insulina e
135 por conta do excesso, o corpo passa a resistir ao efeito da insulina (MAGGIO; PI-
136 SUNYER, 2003). Já o sedentarismo contribui para o desenvolvimento da
137 obesidade sendo também um fator de risco para a diabetes tipo 2 (BLÜHER, 2019).
138 Pessoas acima de 45 anos tem facilidade de desenvolver esta doença pois o
139 envelhecimento traz mudanças metabólicas que podem facilitar a diabetes se
140 desenvolver (BELLARY et al., 2021) além desses, o tabagismo também é um fator
141 pois diminui o controle glicêmico do corpo. Fatores de hereditariedade e genéticos
142 também predis põem a condição da doença. É uma doença que tem aumentado a
143 sua incidência com o passar dos anos de acordo com a World Health Organization
144 Cerca de 422 milhões de pessoas em todo o mundo têm diabetes, a maioria

145 vivendo em países de baixa e média renda, e 1,5 milhão de mortes são
146 diretamente atribuídas ao diabetes a cada ano. Tanto o número de casos quanto a
147 prevalência de diabetes têm aumentado constantemente nas últimas décadas. No
148 Brasil são cerca de 15,8 milhões de pessoas que estão com diabetes (“Dados-
149 Epidemiologicos-SBD_comT1Dindex.pdf”, [s.d.]).

150 2.2. Diabetes gestacional

151 Diabetes gestacional é uma condição metabólica em que os hormônios
152 gestacionais causam ao corpo um aumento na resistência à insulina, essa
153 resistência gera hiperglicemia (ALFADHLI, 2015). No caso da gestação a placenta
154 secreta hormônios e adipocinas que diminuem a efetividade da insulina para que o
155 feto tenha uma oferta maior de alimento, isto porque a nutrição do feto depende
156 totalmente da placenta, causando esse efeito em que a gestante precise produzir
157 mais insulina que o habitual para controlar os níveis de açúcar no sangue. Quando
158 não há o equilíbrio necessário a gestante chega a desenvolver diabetes
159 (BARBOUR et al., 2007).

160 Existem casos de pré-diabetes antes da gestação que facilitam ainda mais o
161 desenvolvimento, além disso, a idade avançada e a obesidade são outros
162 causadores dessa síndrome gestacional (LENDE; RIJHSINGHANI, 2020). A
163 diabetes gestacional apresenta outros problemas além da própria hiperglicemia que
164 seria hipertensão arterial, pré-eclâmpsia e eclâmpsia, também existe o risco de um
165 parto prematuro (HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP et al.,
166 2008). Além de problemas para a gestante, a diabetes gestacional também possui
167 efeitos na prole entre eles o aumento no transporte placentário de glicose,
168 aminoácidos e ácidos graxos algo que estimula a produção de insulina e fator de
169 crescimento podendo trazer como consequência um supercrescimento fetal,
170 podendo resultar em macrossomia no nascimento (SCHWARTZ et al., 1994).

171 A produção excessiva de insulina por parte do feto pode gerar um estresse
172 as células β do pâncreas que estão se desenvolvendo, algo que pode acarretar no
173 recém-nascido um quadro de resistência à insulina. Outra consequência no feto
174 pode ser o efeito contrário gerando um quadro de hipoglicemia, facilitando
175 problemas como lesão cerebral e aumenta o risco de um natimorto (LANGER et al.,
176 2005). De acordo com a International Diabetes Federation Em 2021, cerca de 21,1

177 milhões de nascidos vivos tiveram algum tipo de hiperglicemia durante a gravidez.
178 A condição é mais comum em países de baixa e média renda com acesso limitado
179 a cuidados maternos.

180 2.3. Rins

181 O rim é um órgão do sistema urinário, cuja principal função é controlar a
182 concentração de substâncias como água e sais minerais no sangue, esse controle
183 é feito com a remoção de toxinas e impurezas presentes no sangue (WALLACE,
184 1998). À medida que os rins filtram o sangue, eles absorvem as substâncias que
185 são tóxicas ao corpo como uréia, amônia e ácido úrico, transformando-as em urina
186 (LARINA et al., 2013).

187 As altas concentrações dessas substâncias podem causar uma variedade de
188 problemas ao organismo e até levar ao óbito. Os rins também são essenciais no
189 controle da pressão arterial. Através da remoção do excesso de eletrólitos, como
190 cálcio, potássio, sódio, magnésio, fosfatos, bicarbonatos e outros sais inorgânicos
191 que é feito esse controle. Filtração e reabsorção também ajudam a manter o
192 equilíbrio do pH (DE GROAT; YOSHIMURA, 2015).

193 Com relação a anatomia dos rins eles são um par de órgãos que tem um
194 formato de feijão, o rim direito está localizado na região posterior da cavidade
195 abdominal, com o rim esquerdo estando numa região acima de onde está o rim
196 direito que fica logo abaixo do diafragma e posterior ao fígado, a esquerda abaixo
197 do diafragma e posterior ao baço (SAMPAIO, 2000). Esses órgãos em suas partes
198 superiores são parcialmente protegidos pelas costelas inferiores e são
199 completamente envolvidos por um tecido conjuntivo fibroso chamado de cápsula
200 renal, que é responsável por dar resistência. Aderido à superfície de cada rim há
201 duas camadas de gordura para ajudar a amortecê-los que são a gordura perirrenal
202 e a fásia renal (MAHADEVAN, 2019).

203 Quanto a sua morfologia podem ser divididos em córtex renal, medula renal
204 e pelve renal. Dentro do córtex e da medula estão presentes os néfrons que são
205 unidades de filtração individuais (FORD VERSYPT et al., 2015) (ROMAGNANI et
206 al., 2017).

207 O córtex é todo espaço entre a medula e a cápsula externa, a medula renal
208 fica entre o córtex e a pelve contém a maior parte do comprimento dos néfrons, os

209 néfrons são os principais componentes funcionais do rim, pois são os responsáveis
210 diretos pela filtração do fluido do sangue. A pelve é a responsável por conectar o
211 rim aos sistemas circulatório e nervoso, e ao resto do corpo (RAYNER; THOMAS;
212 MILFORD, 2016), o córtex é irrigado por arteríolas e vênulas da artéria e veia
213 renais, também por capilares glomerulares, para perfundir os néfrons do rim (FORD
214 VERSYPT et al., 2015) o córtex também produz a eritropoetina que é um hormônio,
215 serve para a síntese de glóbulos vermelhos (JELKMANN, 2016).

216 A medula é composta pelas pirâmides renais que são as estruturas que
217 contém os néfrons. A pelve renal é a região que contém o hilo, a parte côncava da
218 forma de feijão, lugar onde transitam os vasos e nervos renais e por onde saem os
219 ureteres que conduzem a urina para fora do corpo. A pelve renal tem a função de
220 conectar o rim ao resto do corpo (DAWOOD, 2022).

221 Na extremidade dos néfrons há uma estrutura que possui um formato de
222 copo chamada cápsula de Bowman. Esta cápsula envolve um conjunto de
223 capilares chamado glomérulo, que é o responsável por transportar o sangue das
224 artérias renais para os néfrons, onde o plasma é filtrado através da cápsula. Depois
225 de entrar na cápsula, o filtrado percorre o túbulo proximal até a alça de Henle e
226 depois flui para o túbulo distal e os dutos coletores seguindo ao ureter. Cada um
227 dos diferentes componentes dos néfrons possuem uma permeabilidade seletiva
228 com relação as moléculas e permite a regulação das concentrações de água e íons
229 no corpo (CORTINOVIS et al., 2022).

230 2.4. Citocinas

231 As citocinas são moléculas que tem a função de sinalizar e regular as
232 respostas imunes e inflamatórias do corpo através de redes de comunicação do
233 sistema imunológico (LIU et al., 2021). Elas são proteínas que possuem baixo peso
234 molecular, glicoproteínas e peptídeos e são secretadas por vários tipos de células
235 entre elas os mastócitos, macrófagos, neutrófilos, leucócitos, células estromais,
236 linfócitos, células natural killer e células T (O'SHEA; MURRAY, 2008) também
237 podem atuar em várias células diferentes, além disso uma mesma citocina pode
238 ser produzida em células diferentes (HIRANO, 1999).

239 Podemos classificar as citocinas em: Fatores de necrose tumoral (TNFs),
240 Interleucinas (ILs), Linfocinas, Monocinas, Interferons (IFNs), Fatores

241 estimuladores de colônias (CSFs), Fatores transformadores de crescimento (TGFs)
242 e Quimiocinas (SPRAGUE; KHALIL, 2009).

243 Também podem ser classificadas em pró-inflamatórias e anti-inflamatórias,
244 as pró-inflamatórias estão envolvidas na regulação positiva de reações
245 inflamatórias, as anti-inflamatórias estão envolvidas na regulação negativa. Entre
246 as pró-inflamatórias podemos citar TNF- α , IL-1 e IL-6 e entre as anti-inflamatórias
247 IL-4, IL-10, IL-13, IFN- α e TGF- β , as principais fontes de produção são os
248 macrófagos (TEDGUI; MALLAT, 2006).

249 O mecanismo de ação das citocinas ocorre com a ligação delas a receptores
250 específicos que se localizam nas superfícies das membranas das células-alvo. A
251 ligação gera alterações dentro das células através da ativação de vias de
252 transdução. O sinal inicial da citocina é amplificado por sistemas do tipo segundo
253 mensageiro, em que se incluem o AMP-c, a fosfocinase A, as fosfolipases e outros
254 (KULBE et al., 2012).

255 2.5. Melatonina

256 A melatonina é um hormônio produzido pelo corpo na glândula pineal, é
257 conhecido como hormônio do sono pois tem a função de regular os ciclos de sono
258 no corpo (CUPP, 1997). Foi descoberta em 1958 por Aaron Lerner e retirada da
259 glândula pineal bovina. Além da glândula pineal existem outros lugares que pode
260 se encontrar a melatonina entre eles a retina, pele, células da medula óssea,
261 linfócitos, plaquetas, glândula Harderiana, cerebelo e no trato gastrointestinal
262 (SLOMINSKI; WORTSMAN; TOBIN, 2005). Segundo (BUBENIK, 2002) A
263 concentração de melatonina nos tecidos gastrointestinais supera os níveis
264 sanguíneos em 10-100 vezes e há pelo menos 400x mais melatonina no trato
265 gastrointestinal do que na glândula pineal (TORDJMAN et al., 2017).

266 A síntese de melatonina é feita pelos pinealócitos a partir triptofano que é um
267 aminoácido, ele é hidroxilado pela triptofano-5-hidroxilase e depois descarboxilado
268 se tornando em serotonina. Somente através de uma ação enzimática a serotonina
269 é transformada em melatonina (AXELROD; WEISSBACH, 1960). Através de duas
270 enzimas a serotonina é sintetizada em melatonina, logo em seguida é liberada na
271 circulação para ser distribuída para os tecidos (TAN et al., 2015).

272 O mecanismo de ação da melatonina está ligado as vias moleculares
273 diferentes, os receptores da membrana celular em que a melatonina se liga
274 determinam o efeito do hormônio sobre a célula (ZHAO et al., 2019). A principal
275 função fisiológica da melatonina é transmitir informações sobre o ciclo diário de luz
276 e escuridão para as estruturas do corpo (CLAUSTRAT; LESTON, 2015), além
277 dessa função a melatonina possui outros efeitos fisiológicos como a diminuição do
278 estresse oxidativo e promove ao corpo a desintoxicação de radicais livres,
279 formação e proteção óssea, reprodução e regulação cardiovascular, proteção
280 cerebral ou gastrointestinal, distúrbios psiquiátricos, doenças cardiovasculares e
281 efeitos oncostáticos (REITER et al., 2016).

282 .

283 **3. OBJETIVOS**

284 3.1. Objetivo Geral

285 Avaliar a ação da melatonina sobre citocinas pró-inflamatórias nos rins da
286 prole de ratas diabéticas, aos 30 e 60 dias de vida.

287 3.2. Objetivos Específicos

288 3.2.1. Analisar imunohistoquimicamente as citocinas pró-inflamatórias TNF α
289 e IL6 nos rins da prole de ratas diabéticas;

290 3.2.2. Analisar morfometricamente os rins da prole de ratas diabéticas.

291

292 **4. METODOLOGIA**

293 Foram utilizadas 15 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*), com 90 dias
294 de idade, virgens, pesando aproximadamente 200g, da linhagem Wistar,
295 procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, da
296 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram
297 confinados em gaiolas e mantidos com alimentação e água *ad libitum*,
298 permanecendo no biotério a temperatura de 22°C e iluminação artificial, produzida
299 por lâmpadas fluorescentes (marca Phillips, modelo luz do dia, 40W),
300 estabelecendo o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o
301 período de luz das 06:00 às 18:00 horas.

302 Após um período de adaptação de sete dias, foram realizados esfregaços
303 vaginais para a determinação do ciclo estral. Os animais que apresentarem três
304 ciclos estrais consecutivos regulares foram submetidos a pinealectomia e mantidos
305 sob diferentes fotoperíodos, sendo para isso, divididos, ao acaso, em três grupos,
306 com cinco fêmeas cada, e de cada uma das fêmeas foram separadas a prole de
307 acordo com os grupos.

308

309 Grupo I – neonatos (n=12) nascidos de matrizes não diabéticas, mantidos
310 em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e eutanasiados após 30 e 60 dias de vida
311 para análise dos rins;

312

313 Grupo II - neonatos (n=12) nascidos de matrizes induzidas ao diabetes
314 durante a gestação, mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas e eutanasiados
315 após 30 e 60 dias de vida para análise dos rins;

316

317 Grupo III - neonatos (n=12) nascidos de matrizes induzidas ao diabetes
318 durante a gestação e tratadas simultaneamente com melatonina, mantidos em ciclo
319 claro/escuro de 12/12 horas e eutanasiados após 30 e 60 dias de vida para análise
320 dos rins.

321 4.1. Acasalamento dos animais e diagnóstico da prenhez

322 As fêmeas que estavam ciclando foram acasaladas na proporção de um
323 macho para duas fêmeas, sempre no início da noite (18:00h). Na manhã (06:00h)
324 do dia seguinte, foram realizados exames colpocitológicos para a confirmação do
325 acasalamento, tomando-se como parâmetro à presença de espermatozoides nos
326 esfregaços. Essas lâminas foram imediatamente mergulhadas em uma solução de
327 álcool-éter, em partes iguais, e depois, foram coradas pelo método Shorr-Harris.

328 4.2. Indução do Diabetes Gestacional

329 foi induzido, após confirmação do acasalamento, por meio administração
330 intraperitoneal de solução de estreptozotocina (Sigma Chemical Co., USA) após
331 jejum alimentar de 14 horas. A estreptozotocina foi diluída em tampão citrato de
332 sódio a 10 mM e pH 4,5, na dosagem única de 60 mg/kg de peso do animal. Os

333 animais não diabéticos (grupo controle) receberam da mesma forma, doses
334 equivalentes de solução salina e decorridos 30 minutos da administração todos os
335 animais serão alimentados normalmente (Dall'ago et al., 2002). Foram incluídos no
336 estudo apenas as fêmeas que apresentarem glicose sanguínea acima de 200
337 mg/dL (Glicosímetro Kit Accu-Chek Activ), para início do tratamento com a
338 melatonina.

339 4.3. Tratamento com Melatonina

340 A melatonina, N-acetil-5-metoxitriptamina (Sigma Chemical Co., St. Louis,
341 USA) foi administrada em injeções diárias de 0,8 mg/Kg, por toda a gestação. A
342 melatonina foi dissolvida em 0,2 mL de etanol e diluída em 0,8mL NaCl a 0,9%. As
343 injeções aplicadas via intraperitoneal, sempre no período das 18:00 às 19:00h. Esta
344 dose é comparável a dosagem humana (9 mg/kg), a qual foi convertida com base
345 na área de superfície do corpo (Paget; Barne, 1994; Moustafa et al., 1999; Abd-
346 Allah et al., 2003).

347 4.4. Microscopia de Luz

348 Foram utilizados dez filhotes aos 30 e 60 dias de vida de cada grupo
349 experimental. Os filhotes serão anestesiados com hidrocloridrato de cetamina (80
350 mg/kg) e xilazina (6,0 mg/kg) por via intramuscular. Após, foi realizada a abertura
351 da cavidade abdominal desde o púbis até o rebordo das costelas para a coleta dos
352 rins. Após a coleta foi realizada a eutanásia com aprofundamento da anestesia até
353 dose letal. Fragmentos dos rins foram mergulhados em formol tamponado,
354 permanecendo no mesmo por 48 horas. Após esses procedimentos foram
355 desidratados em álcool etílico (concentrações crescentes), diafanizados pelo xilol,
356 impregnados e incluídos em "paraplast". A seguir, os blocos foram cortados em
357 micrótomo do tipo Minot (Leica RM 2035) ajustado para 5 µm. Em sequência, os
358 cortes foram submetidos à técnica de coloração pela hematoxilina - eosina (H. E.) e
359 analisados em microscópio de luz, da marca OLYMPUS BX-49 e fotografados em
360 microscópio OLYMPUS BX-50.

361

362 4.5. Análise imunohistoquímica

363 Para análise imunohistoquímica, as lâminas foram desparafinizadas e
364 reidratadas em xilol e alcoóis. A recuperação antigênica será realizada através de
365 uma solução de tampão citrato (pH 8.0) em alta temperatura no microondas por 5
366 minutos. A peroxidase endógena foi inibida através de uma solução de peróxido de
367 hidrogênio (3%) em metanol. A reação antígeno-anticorpo inespecífica foi
368 bloqueada através da incubação das lâminas em PBS e albumina sérica bovina
369 (BSA) 5% durante uma hora. Todos os anticorpos (Santa Cruz Biotechnology Inc.,
370 Santa Cruz, CA, EUA) foram diluídos em PBS/BSA 1% por uma hora.
371 Subsequentemente, as lâminas foram tratadas com o anticorpo secundário por
372 trinta minutos. A reação antígeno-anticorpo foi observada através de um
373 precipitado marrom após aplicação de 3,3 diaminobenzidina por quatro minutos e
374 contracolorados com hematoxilina. As imagens foram capturadas por meio de
375 câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao microscópio Olympus® Bx50, as quais foram
376 submetidas ao aplicativo Gimp 2.0 para a quantificação por meio de Histograma
377 RGB (Red-Green-Blue), o qual se baseia na intensidade de luminescência onde os
378 tons dos pixels da imagem variam de 0 a 255, sendo que o tom 0 representa o
379 escuro absoluto (menor luminescência), enquanto que o tom 255, representa o
380 branco absoluto (maior luminescência) (Oberholzer et al., 1996; Lee et al., 2001).

381 4.6. Análise morfométrica

382 Para a análise morfométrica dos rins, foram utilizadas três lâminas de cada
383 grupo e analisados dez glomérulos em cada lâmina. As medidas foram restritas aos
384 glomérulos que demonstraram, num único corte, os pólos vascular e urinário. Essa
385 disposição indica a secção coincidente com a região equatorial do glomérulo. Para
386 as mensurações foram utilizados os glomérulos selecionados ao acaso. A captura
387 da imagem foi efetuada através de câmera de Vídeo Sony®, acoplada ao
388 microscópio Olympus® Bx50. A morfometria foi realizada através de aplicativo
389 Morfometria de Linhas, calibrado em micrômetros, associado ao programa
390 Optimas® 6.2 para Windows. Para a obtenção da área glomerular o cursor foi
391 posicionado na área central do glomérulo, estabelecendo-se, a partir daí, uma linha
392 circular externa, coincidente com os limites do tufo glomerular. Para mensuração
393 da cápsula de Bowman foi adotado a mesma metodologia (Akaoka et al., 1994). O

394 volume glomerular e da cápsula de Bowman, foi calculado de acordo com os
395 critérios preconizados por Pagtalunan et al. (2000). Para essa estimativa, utilizou-
396 se a equação $\frac{4}{3}\pi r^3$, destinada ao cálculo do volume da esfera, na qual "r"
397 representa o raio.

398 4.7. Análise estatística

399 Para a comparação dos dados morfométricos foram realizadas a Análise de
400 Variância, quando significativa esta foi complementada pelo teste de Comparações
401 Múltiplas de Tukey e Kramer. Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($p < 0,05$).
402

403 **5. RESULTADOS**

404 5.1. Imunohistoquímica

405 Houve marcação para as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF α nos rins dos
406 filhotes de matrizes induzidas ou não ao diabetes durante a gestação, tanto aos 30
407 como aos 60 dias de vida. Essa marcação predominou principalmente nos
408 glomérulos renais (Figuras 1 e 2). A análise da quantificação dessas citocinas,
409 revelou uma maior expressão nos rins dos filhotes do grupo GD, diferindo
410 significativamente dos demais grupos, que não diferiram entre si (Figuras 3 e 4).

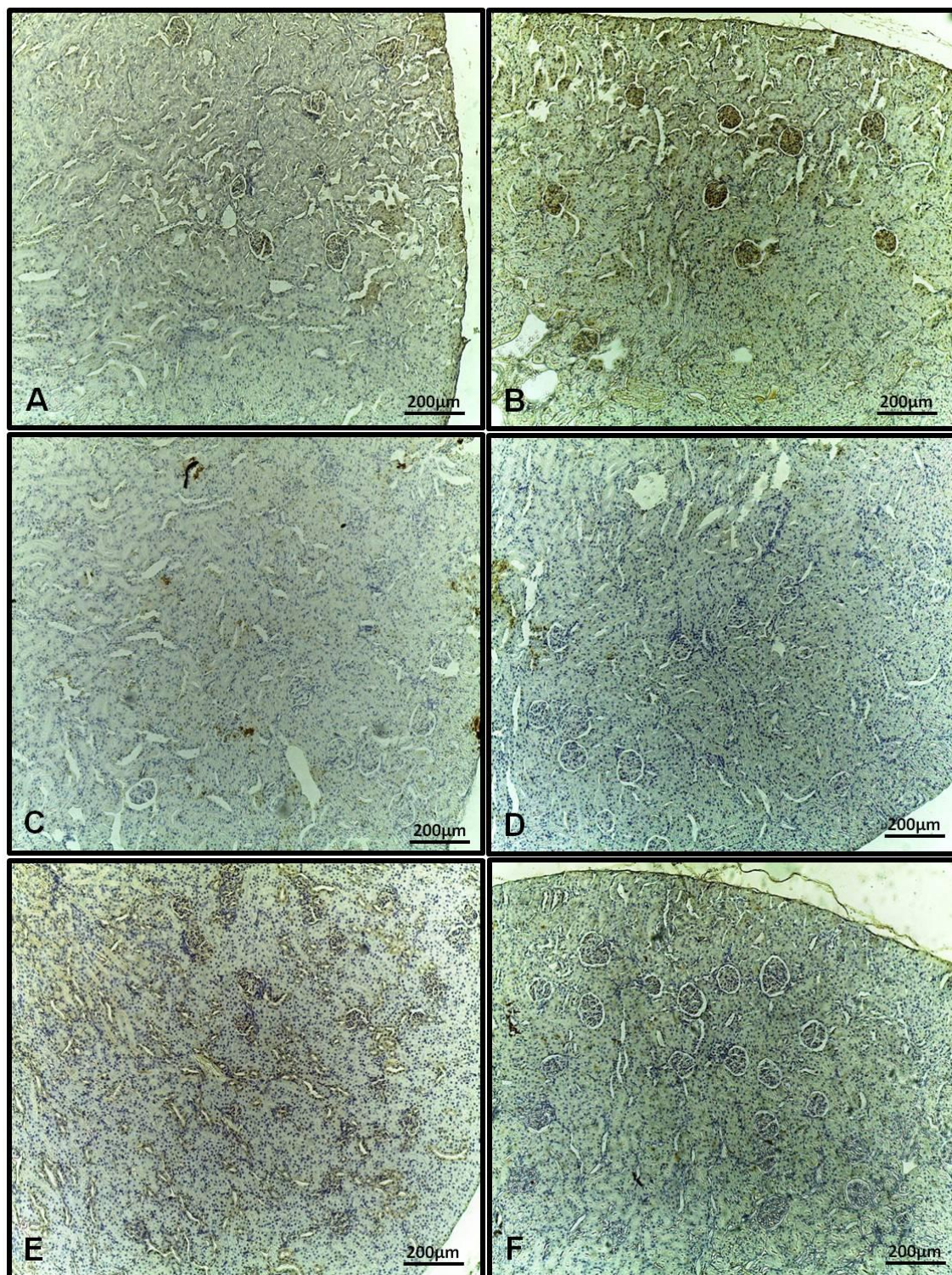
411 5.2. Análise morfométrica

412 A análise morfométrica dos rins revelou que os animais do grupo GD
413 apresentaram aumento do diâmetro e volume glomerular, e do diâmetro e volume
414 da cápsula de Bowman, diferindo significativamente dos demais grupos (Tabelas 1
415 e 2).

416

417

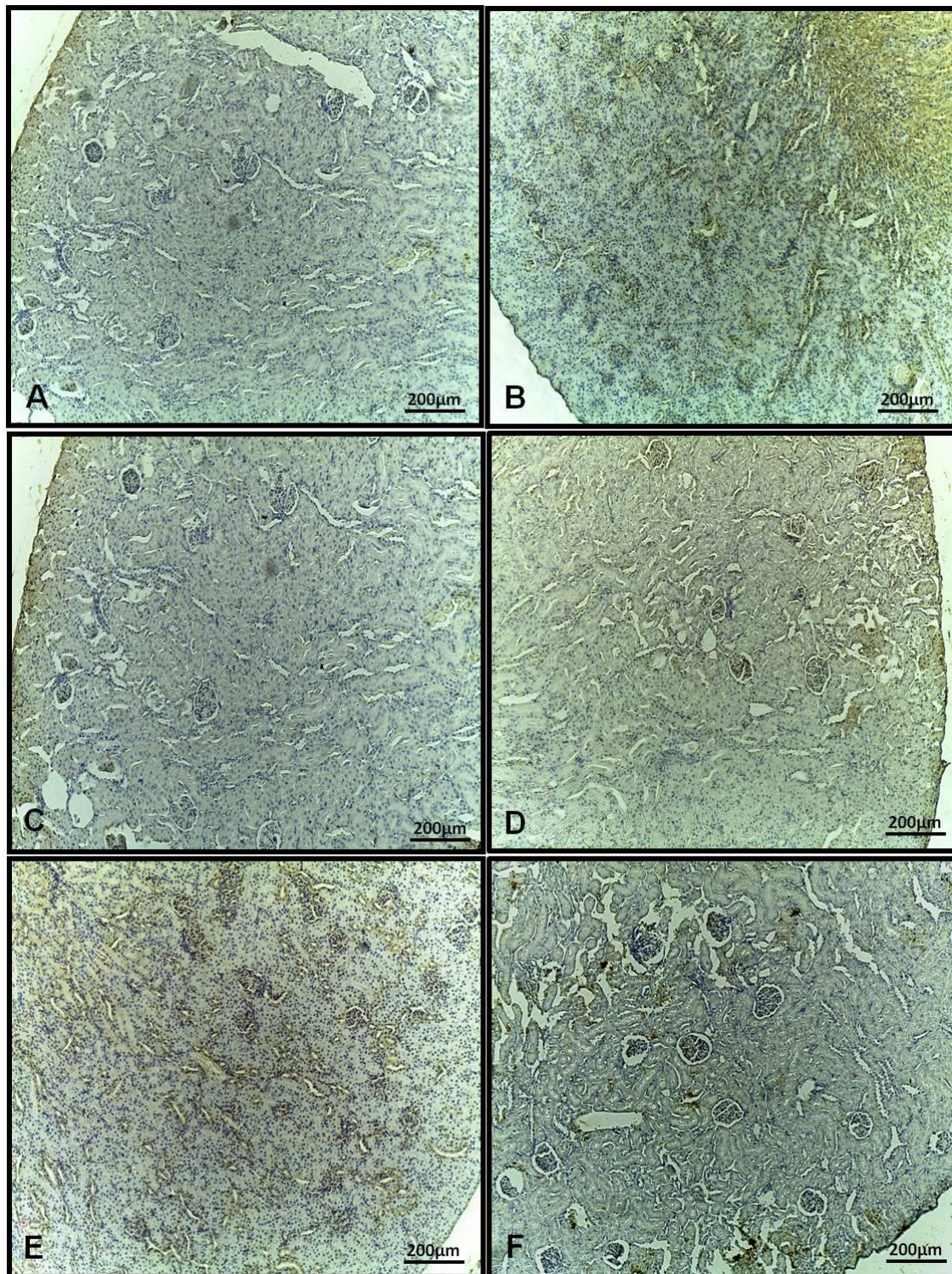
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439



440 **Figura 1.** Imunohistoquímica para o IL-6 nos rins dos filhotes dos grupos
441 experimentais aos 30 (A, B e C) e 60 (D, E e F) dias de vida. A e D (GC), B e E
442 (GD), C e F (GDM). Verificar marcação em todos os grupos, sendo mais expressiva
443 no grupo GD (B e E).

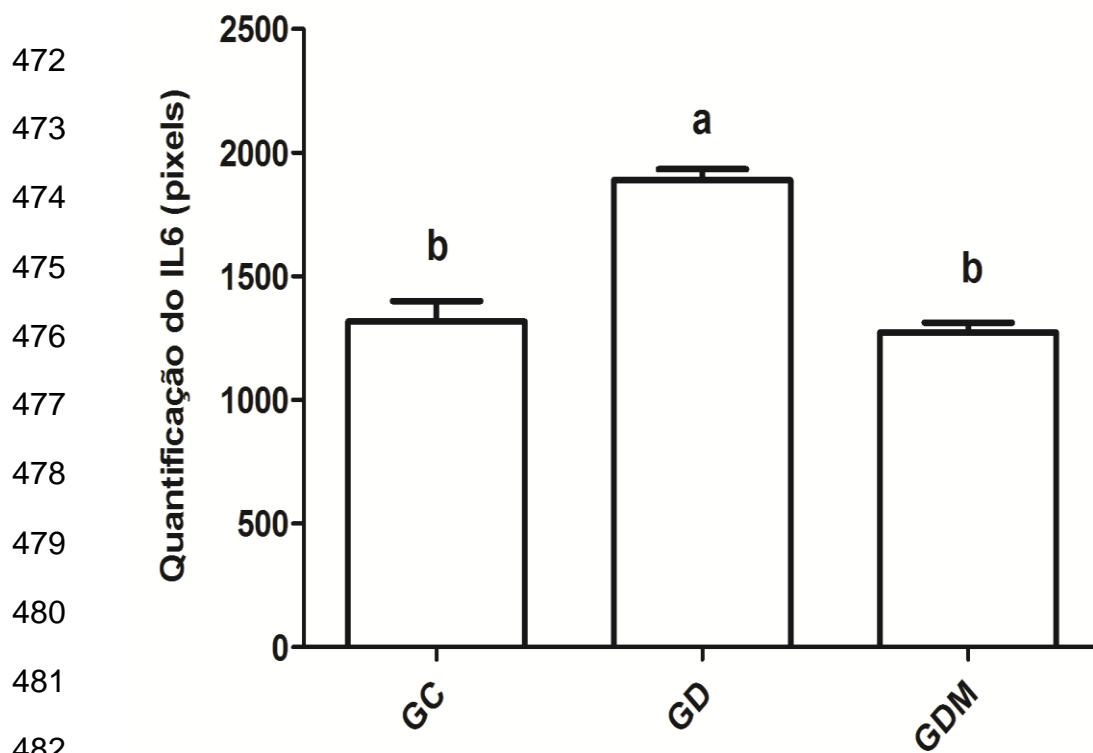
444

445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466

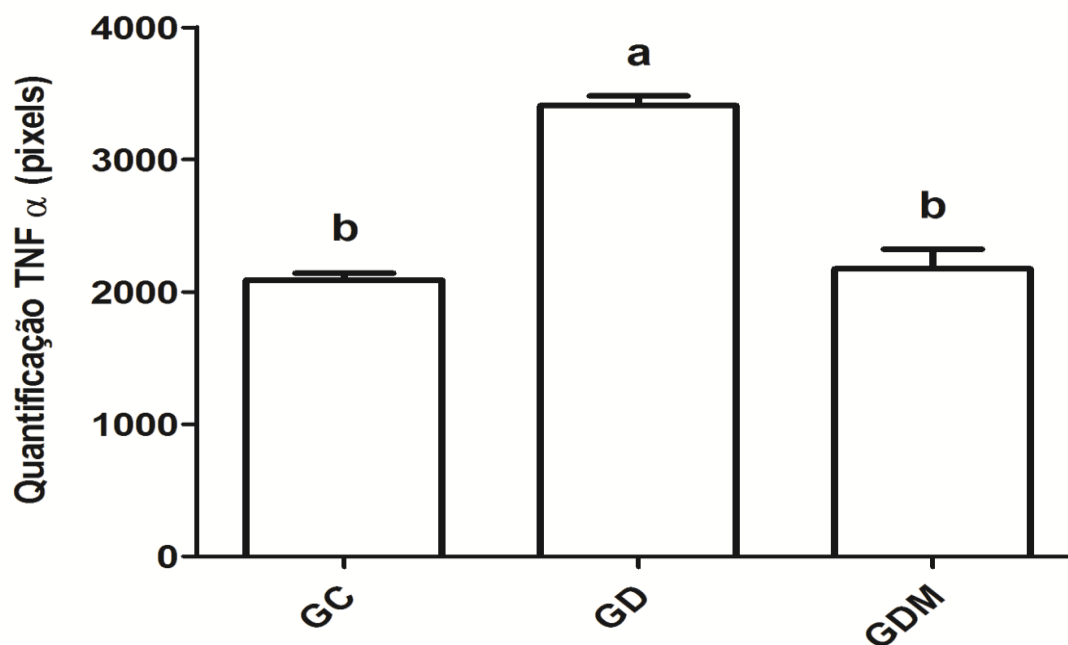


467 **Figura 2.** Imunohistoquímica para o TNF α nos rins dos filhotes dos grupos
468 experimentais aos 30 (A, B e C) e 60 (D, E e F) dias de vida. A e D (GC), B e E
469 (GD), C e F (GDM). Verificar marcação em todos os grupos, sendo mais expressiva
470 no grupo GD (B e E).

471



483 **Figura 3:** Quantificação do IL6 em pixels. Médias seguidas pela mesma letra não
484 diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e
485 Kramer ($p < 0,05$).



486
487 **Figura 4:** Quantificação do TNF α em pixels. Médias seguidas pela mesma letra
488 não diferem significativamente entre si teste de Comparações Múltiplas de Tukey e
489 Kramer ($p < 0,05$).

490 **Tabela 1.** Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo
 491 (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos filhotes dos
 492 grupos experimentais, aos 30 dias de vida.

Grupos	DG (μm)	VG ($\times 10^5 \mu\text{m}^3$)	DCB (μm)	VCB ($\times 10^5 \mu\text{m}^3$)
GC	45,76 \pm 2,61b	2,76 \pm 0,31b	51,32 \pm 1,68b	3,70 \pm 0,14b
GD	63,12 \pm 1,09 ^a	4,33 \pm 0,16 ^a	63,89 \pm 2,73a	4,98 \pm 0,05a
GDM	43,43 \pm 2,45b	2,62 \pm 0,22b	49,08 \pm 3,23b	3,09 \pm 0,87b
P	0,0011	0,0105	0,0222	0,0114

493 Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre
 494 si pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer ($p < 0,05$).

495

496 **Tabela 2.** Média \pm desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo
 497 (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos filhotes dos
 498 grupos experimentais, aos 60 dias de vida.

Grupos	DG (μm)	VG ($\times 10^5 \mu\text{m}^3$)	DCB (μm)	VCB ($\times 10^5 \mu\text{m}^3$)
GC	55,21 \pm 3,56b	3,44 \pm 0,19b	53,23 \pm 1,41b	4,50 \pm 0,11b
GD	66,18 \pm 1,12 ^a	4,48 \pm 0,54 ^a	64,54 \pm 2,02a	5,89 \pm 0,72a
GDM	53,79 \pm 2,29b	3,16 \pm 0,51b	51,93 \pm 2,51b	4,23 \pm 0,69b
P	0,0302	0,0412	0,0055	0,0106

499 Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre
 500 si pelo teste de Comparações Múltiplas de Tukey e Kramer ($p < 0,05$).

501

502 6. DISCUSSÃO

503

504 O diabetes gestacional é considerada pela Organização Mundial da Saúde
505 (OMS) como sendo um dos tipos de diabetes mellitus (SWEETING et al., 2022).
506 Essa diabetes tem efeitos na prole em que pode tornar os filhotes diabéticos ou
507 mais suscetíveis a essa doença (SHASHIKADZE et al., 2021). Neste trabalho os
508 resultados obtidos mostram houve marcação das citocinas TNF α e IL-6 no grupo
509 GD tanto nos de 30 quanto de 60 dias, mostrando a persistência dos efeitos
510 mesmo com o passar do tempo. O aumento dos níveis destas citocinas é
511 consequência das ações inflamatórias causadas pelo diabetes, essas inflamações
512 são uma resposta imuneo (CHEN et al., 2017; BÖNI-SCHNETZLER; MEIER,
513 2019), que se ligam a receptores específicos e sinalizam ao sistema imunológico
514 do corpo (CALLE; FERNANDEZ, 2012; AKBARI; HASSAN-ZADEH, 2018). As
515 inflamações são consequências dos distúrbios metabólicos que foram causados ao
516 ciclo da glicose, trazendo uma glicotoxicidade como consequência da
517 hiperglicemia. Esse aumento da glicose gera um grande estresse oxidativo nas
518 células que são afetadas e por todo o corpo, além de uma liberação de radicais
519 livres que não são absorvidos pelo corpo (DARENKAYA; KOLESNIKOVA;
520 KOLESNIKOV, 2021).

521 Nos rins dos animais do GDM verificou-se que os níveis dessas citocinas não
522 se diferenciaram em relação ao grupo GC, sugerindo uma grande eficácia da
523 melatonina na prevenção dos efeitos inflamatórios e de oxidação causados pela
524 diabetes. Tordjman et al., (2017), observaram as propriedades da melatonina em
525 absorver radicais livres, devido aos seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios
526 (CHITIMUS et al., 2020). Assim, podemos inferir que a melatonina foi capaz de
527 prevenir o aumento dos índices de citocinas pró-inflamatórias e reduzir o nível de
528 inflamação causados pela diabetes as células renais, provalvemente neutralizando
529 os radicais livres e prevenindo a glicotoxicidade materna (REITER et al., 2016;
530 ANTON et al., 2021).

531 Com relação as análises morfométricas, verificou-se que houve aumento no
532 volume glomerular e da cápsula de bowman no grupo GD tanto nos animais com
533 30 de vida, quanto nos de 60 dias. Esse aumento ocorre como consequência da

534 diabetes que gera esse aumento por causa da glicotoxicidade que gera acúmulo e
535 reservas de proteínas plasmáticas aumentando o tamanho dos glomérulos
536 (ALICIC; ROONEY; TUTTLE, 2017). Diferente do GD o GDM não apresentou
537 mudanças morfométricas em relação ao grupo controle, isto porque as propriedades
538 da melatonina preveniram esse efeito da hiperglicemia, permitindo que os
539 glomélulos e a capsula de Bowman permanecessem em seu tamanho natural (TANG
540 et al., 2022).

541

542 **7. CONCLUSÃO**

543 Podemos concluir que a melatonina previne alterações renais na prole de
544 ratas induzidas ao diabetes durante a gestação, podendo ser uma promissora
545 alternativa no tratamento do diabetes materno no período gestacional.

546

547 **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

548

549 **AKBARI, M.; HASSAN-ZADEH, V. IL-6 signalling pathways and the**
550 **development of type 2 diabetes.** *Inflammopharmacology*, v. 26, n. 3, p. 685–698,
551 jun. 2018.

552 **ALFADHLI, E. M. Gestational diabetes mellitus.** *Saudi Medical Journal*, v. 36, n.
553 4, p. 399–406, 2015.

554 **ALICIC, R. Z.; ROONEY, M. T.; TUTTLE, K. R. Diabetic Kidney Disease:**
555 **Challenges, Progress, and Possibilities.** *Clinical journal of the American Society*
556 *of Nephrology: CJASN*, v. 12, n. 12, p. 2032–2045, 7 dez. 2017.

557 **ANTON, D.-M. et al. Study on the Effects of Melatonin on Glycemic Control and**
558 **Periodontal Parameters in Patients with Type II Diabetes Mellitus and**
559 **Periodontal Disease.** *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, v. 57, n. 2, p. 140, 5 fev. 2021.

560 **AXELROD, J.; WEISSBACH, H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin**
561 **to melatonin.** *Science (New York, N.Y.)*, v. 131, n. 3409, p. 1312, 29 abr. 1960.

562 **BARBOUR, L. A. et al. Cellular mechanisms for insulin resistance in normal**
563 **pregnancy and gestational diabetes.** *Diabetes Care*, v. 30 Suppl 2, p. S112-119,
564 jul. 2007.

565 **BÖNI-SCHNETZLER, M.; MEIER, D. T. Islet inflammation in type 2 diabetes.**
566 *Seminars in Immunopathology*, v. 41, n. 4, p. 501–513, 2019.

567 **BUBENIK, G. A. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical**
568 **relevance.** *Digestive Diseases and Sciences*, v. 47, n. 10, p. 2336–2348, out. 2002.

569 **CALLE, M. C.; FERNANDEZ, M. L. Inflammation and type 2 diabetes.** *Diabetes &*
570 *Metabolism*, v. 38, n. 3, p. 183–191, jun. 2012.

571 **CATALANO, P. M. et al. Longitudinal changes in glucose metabolism during**
572 **pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational**
573 **diabetes mellitus.** *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 180, n. 4, p.
574 903–916, 1 abr. 1999.

575 **CHEN, Y.-L. et al. Serum TNF- α concentrations in type 2 diabetes mellitus**
576 **patients and diabetic nephropathy patients: A systematic review and meta-**
577 **analysis.** *Immunology Letters*, v. 186, p. 52–58, jun. 2017.

578 **CHITIMUS, D. M. et al. Melatonin's Impact on Antioxidative and Anti-**
579 **Inflammatory Reprogramming in Homeostasis and Disease.** *Biomolecules*, v.
580 10, n. 9, p. 1211, 20 ago. 2020.

- 581 CLAUSTRAT, B.; LESTON, J. **Melatonin: Physiological effects in humans.**
582 *Neuro-Chirurgie*, v. 61, n. 2–3, p. 77–84, 2015.
- 583 CORTINOVIS, M. et al. **Glomerular hyperfiltration.** *Nature Reviews. Nephrology*,
584 v. 18, n. 7, p. 435–451, jul. 2022.
- 585 CUPP, M. J. **Melatonin.** *American Family Physician*, v. 56, n. 5, p. 1421–1425,
586 1428, 1 out. 1997.
- 587 DARENSKAYA, M. A.; KOLESNIKOVA, L. I.; KOLESNIKOV, S. I. **Oxidative**
588 **Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and**
589 **Therapeutic Approaches to Correction.** *Bulletin of Experimental Biology and*
590 *Medicine*, v. 171, n. 2, p. 179–189, 2021.
- 591 DAWOOD, G. *Urinary System.* Em: DAWOOD, G. (Ed.). **Color Atlas of Human**
592 **Gross Pathology.** Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 75–91.
- 593 DE GROAT, W. C.; YOSHIMURA, N. **Anatomy and physiology of the lower**
594 **urinary tract.** *Handbook of Clinical Neurology*, v. 130, p. 61–108, 2015.
- 595 DEFRONZO, R. A. **From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New**
596 **Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus.** *Diabetes*, v. 58, n. 4, p.
597 773–795, abr. 2009.
- 598 FORD VERSYPT, A. N. et al. **Bifurcation study of blood flow control in the**
599 **kidney.** *Mathematical Biosciences*, v. 263, p. 169–179, maio 2015.
- 600 HAPO STUDY COOPERATIVE RESEARCH GROUP et al. **Hyperglycemia and**
601 **adverse pregnancy outcomes.** *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n.
602 19, p. 1991–2002, 8 maio 2008.
- 603 HIRANO, T. **Molecular basis underlying functional pleiotropy of cytokines and**
604 **growth factors.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 260, n.
605 2, p. 303–308, 5 jul. 1999.
- 606 IDRIS, H. T.; NAISMITH, J. H. **TNF alpha and the TNF receptor superfamily:**
607 **structure-function relationship(s).** *Microscopy Research and Technique*, v. 50, n. 3,
608 p. 184–195, 1 ago. 2000.
- 609 JELKMANN, W. **Erythropoietin.** *Frontiers of Hormone Research*, v. 47, p. 115–
610 127, 2016.
- 611 KULBE, H. et al. **A dynamic inflammatory cytokine network in the human**
612 **ovarian cancer microenvironment.** *Cancer Research*, v. 72, n. 1, p. 66–75, 1 jan.
613 2012.

- 614 LANGER, O. et al. **Gestational diabetes: the consequences of not treating.**
615 American Journal of Obstetrics and Gynecology, v. 192, n. 4, p. 989–997, abr.
616 2005.
- 617 LAPPAS, M. et al. **The role of oxidative stress in the pathophysiology of**
618 **gestational diabetes mellitus.** Antioxidants & Redox Signaling, v. 15, n. 12, p.
619 3061–3100, 15 dez. 2011.
- 620 LARINA, I. M. et al. **[The formation of the urine proteome in healthy human].**
621 Fiziologija Cheloveka, v. 39, n. 2, p. 43–59, 2013.
- 622 LENDE, M.; RIJHSINGHANI, A. **Gestational Diabetes: Overview with Emphasis**
623 **on Medical Management.** International Journal of Environmental Research and
624 Public Health, v. 17, n. 24, p. 9573, 21 dez. 2020.
- 625 LIU, C. et al. Cytokines: **From Clinical Significance to Quantification.** Advanced
626 Science (Weinheim, Baden-Wurtemberg, Germany), v. 8, n. 15, p. e2004433, ago.
627 2021.
- 628 MAHADEVAN, V. **Anatomy of the kidney and ureter.** Surgery (Oxford), v. 37, n.
629 7, p. 359–364, 1 jul. 2019.
- 630 O'SHEA, J. J.; MURRAY, P. J. **Cytokine signaling modules in inflammatory**
631 **responses.** Immunity, v. 28, n. 4, p. 477–487, abr. 2008.
- 632 RAYNER, H.; THOMAS, M.; MILFORD, D. **Kidney Anatomy and Physiology.** Em:
633 RAYNER, H. C.; THOMAS, M.; MILFORD, D. (Eds.). Understanding Kidney
634 Diseases. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–10.
- 635 REAVEN, G. **Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic**
636 **individuals.** Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 32, n. 8, p.
637 1754–1759, ago. 2012.
- 638 REITER, R. J. et al. **Melatonin as an antioxidant:** under promises but over
639 delivers. Journal of Pineal Research, v. 61, n. 3, p. 253–278, out. 2016.
- 640 ROMAGNANI, P. et al. **Chronic kidney disease.** Nature Reviews. Disease
641 Primers, v. 3, p. 17088, 23 nov. 2017.
- 642 SAMPAIO, F. J. Renal anatomy. **Endourologic considerations.** The Urologic
643 Clinics of North America, v. 27, n. 4, p. 585–607, vii, nov. 2000.
- 644 SCHWARTZ, R. et al. **Hyperinsulinemia and Macrosomia in the Fetus of the**
645 **Diabetic Mother.** Diabetes Care, v. 17, n. 7, p. 640–648, 1 jul. 1994.
- 646 SHARMA, P. et al. **COVID-19 and diabetes: Association intensify risk factors**
647 **for morbidity and mortality.** Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine &
648 Pharmacotherapie, v. 151, p. 113089, jul. 2022.

- 649 SHASHIKADZE, B. et al. **Developmental Effects of (Pre-)Gestational Diabetes**
650 **on Offspring: Systematic Screening Using Omics Approaches.** Genes, v. 12, n. 12,
651 p. 1991, 15 dez. 2021.
- 652 SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J.; TOBIN, D. J. **The cutaneous**
653 **serotonergic/melatoninergic system: securing a place under the sun.**
654 FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for
655 Experimental Biology, v. 19, n. 2, p. 176–194, fev. 2005.
- 656 SPRAGUE, A. H.; KHALIL, R. A. **Inflammatory Cytokines in Vascular**
657 **Dysfunction and Vascular Disease.** Biochemical pharmacology, v. 78, n. 6, p.
658 539–552, 15 set. 2009.
- 659 SWEETING, A. et al. **A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus.**
660 Endocrine Reviews, v. 43, n. 5, p. 763–793, 26 set. 2022.
- 661 SZMUILOWICZ, E. D.; JOSEFSON, J. L.; METZGER, B. E. **Gestational Diabetes**
662 **Mellitus.** Endocrinology and metabolism clinics of North America, v. 48, n. 3, p.
663 479–493, set. 2019.
- 664 TAN, D.-X. et al. **Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant:**
665 **Synthesis and Metabolism.** Molecules (Basel, Switzerland), v. 20, n. 10, p.
666 18886–18906, 16 out. 2015.
- 667 TANAKA, T. et al. **Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases.** Advances in
668 Experimental Medicine and Biology, v. 941, p. 79–88, 2016.
- 669 TANG, H. et al. **Melatonin alleviates renal injury by activating mitophagy in**
670 **diabetic nephropathy.** Frontiers in Endocrinology, v. 13, p. 889729, 2022.
- 671 TEDGUI, A.; MALLAT, Z. **Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and**
672 **regulatory pathways.** Physiological Reviews, v. 86, n. 2, p. 515–581, abr. 2006.
- 673 TORDJMAN, S. et al. **Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic**
674 **Benefits.** Current Neuropharmacology, v. 15, n. 3, p. 434–443, abr. 2017.
- 675 WALLACE, M. A. **Anatomy and physiology of the kidney.** AORN journal, v. 68, n.
676 5, p. 800, 803–816, 819–820; quiz 821–824, nov. 1998.
- 677 ZHAO, C.-N. et al. **Potential role of melatonin in autoimmune diseases.**
678 **Cytokine & Growth Factor Reviews,** v. 48, p. 1–10, ago. 2019.
- 679 Boshtam M, Asgary S, Kouhpayeh S, Shariati L, Khanahmad H. Aptamers Against
680 Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review. Inflammation. 2017 Feb.
- 681 Zaccardi F, Webb DR, Yates T, Davies MJ. Pathophysiology of type 1 and type 2
682 diabetes mellitus: a 90-year perspective. Postgrad Med J. 2016 Feb.

- 683 Wu, Y., Ding, Y., Tanaka, Y., Zhang, W. (2014). **Risk Factors Contributing to**
684 **Type 2 Diabetes and Recent Advances in the Treatment and Prevention.**
685 *International Journal of Medical Sciences*, 11(11), 1185-1200.
- 686 GILLESPIE, Kathleen M. **Diabetes tipo 1: patogênese e prevenção.** CMAJ julho
687 de 2006, 175 (2) 165-170; DOI:10.1503/cmaj.060244
- 688 Galicia-Garcia, U.; Benito-Vicente, A.; Jebari, S.; Larrea-Sebal, A.; Siddiqi, H.;
689 Uribe, K.B.; Ostolaza, H.; Martín, C. **Pathophysiology of Type 2 Diabetes**
690 **Mellitus.** *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6275.
- 691 Roden M., Shulman GI **A biologia integrativa do diabetes tipo 2.** *Natureza.* 2019;
692 576 :51–60. doi: 10.1038/s41586-019-1797-8.
- 693 Stumvoll M., Goldstein BJ, van Haeften TW **Tipo 2 diabetes: Princípios de**
694 **patogênese e terapia.** *Lanceta.* 2005; 365 :1333–1346. doi: 10.1016/S0140-
695 6736(05)61032-X.
- 696
697 Chatterjee S., Khunti K., Davies MJ **Diabetes tipo 2.** *Lanceta.* 2017; 389 :2239–
698 2251. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
- 699
700 Schwartz SS, Epstein S., Corkey BE, Grant SF, Gavin JR, 3º, Aguilar RB **A hora é**
701 **certa para um novo sistema de classificação para diabetes: Justificativa e**
702 **implicações do esquema de classificação beta-Cell-Centric. Cuidados com o**
703 **Diabetes.** 2016; 39 :179–186. doi: 10.2337/dc15-1585.