

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS E ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS
DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA TRATADOS COM EXTRATO
AQUOSO DE *Vochysia rufa*

Izabela Barbosa Moraes

Uberlândia

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS
DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA TRATADOS COM EXTRATO
AQUOSO DE *Vochysia rufa*

Izabela Barbosa Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

Co-orientador: Dra. Neire Moura de Gouveia

Uberlândia

2013

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus, pois sendo Criador é o responsável por toda a vida.

Agradeço aos meus pais Izabel e Rafael porque foram eles que me ensinaram os valores que hoje eu tenho, e que me ajudaram a moldar minha personalidade e caráter, e também me ensinaram que a família é o nosso presente mais valioso, e em todos os momentos estiveram comigo, me apoiaram nas minhas escolhas e me ensinaram o que realmente importa.

Ao meu irmão Rodrigo pela força e exemplo de coragem e perseverante, me mostrando que o mais importante é continuar acreditar em si mesmo, independente do que aconteça.

À minha irmã Bruna, pela amizade, companheirismo, sinceridade e meiguice... Minha irmãzinha mais nova que muitas vezes parece ser bem mais forte do que eu, e assim vai crescendo e cativando todos ao seu redor, com seu jeitinho único de ser!

Ao meu amado esposo Rodrigo pela nossa caminhada, os momentos de alegria e incentivo para jamais desistir dos meus sonhos. Sou grata pela paciência, amizade, amor e carinho. E por partilhar comigo de todas as conquistas, estando ao meu lado nas horas mais difíceis e mais felizes. Amo muito você, eternamente.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola pelos ensinamentos e orientação, e por ter me recebido no laboratório possibilitando a realização desse trabalho e de outros projetos.

À Dra. Neire Moura de Gouveia que esteve envolvida desde o início da concepção desse projeto, até a sua realização, me auxiliando, ensinando e partilhando de diversos momentos com incentivo, paciência e dedicação. Além disso, contribuiu de forma determinante para o meu aprendizado, através da discussão de artigos e grupos de estudo.

À Profa. Dra. Luciana Karen Calábria pelas instruções e ensinamentos durante todo o projeto, principalmente na reta final com a técnica de Western Blotting.

Ao Prof. Alberto da Silva Moraes pelas importantes contribuições ao trabalho auxiliando, revisando e me orientando em diversos aspectos experimentais e teóricos.

À Profa. Karen Renata Hiraki pelo auxílio na análise do material histológico e pela dedicação em fazer parte do desenvolvimento do presente estudo.

Ao Prof. Marcelo Emilio Beletti que em muitos momentos abriu as portas do laboratório de Análise de Imagem, tanto para o preparo do material histológico, como o processamento e análise do material em Microscopia Eletrônica.

A toda a equipe do Grupo Vochysia Luciana, Neire, Alice, Aline, Camilla, Douglas e Hélen porque mais que um grupo de estudos, se tornaram verdadeiros amigos, me ajudando com os experimentos e promovendo um ambiente saudável de aprendizado e troca de informações por meio da discussão de artigos.

Agradeço às minhas florzinhas Camilla e Hélen que são grandes amigas!! Agradeço pela amizade, pelo apoio, pelas conversas que em muitos momentos serviram de desabafo e foram revigorantes para mim, me trazendo novo ânimo para continuar seguindo em frente.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida! E de forma especial ao “grupo das nove da 65”, pelas risadas, descontrações, apoio e amizade!

E aos meus amigos do AGUIA (em especial: Thamy, Felipe, Juan Emanuel, Geanne, Karla e Bruna) porque são eles meu maior ponto de apoio, são os responsáveis por horas e horas de gargalhadas e muitos momentos de oração que para mim tiveram um significado único. Ensinarão-me o que realmente significa superar os obstáculos da vida.

Ao PET/Biologia por todo aprendizado que contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional, pois tive oportunidade de trabalhar com pessoas maravilhosas e foram experiências de grande valia para a minha vida pessoal e acadêmica.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular pelo coleguismo e apoio em diversas situações.

Aos membros da banca examinadora, pela disposição em ler esse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo incentivo financeiro para a realização do projeto.

E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de mestrado, contribuindo para a realização desta dissertação.

“Milagres acontecem quando a gente vai à luta!”
(O Teatro Mágico)

*Romper as barreiras
Voar mais alto
Libertar-se
Permitir-se
Ir além...*
- Izabela Moraes -

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) é caracterizado pelo aumento significativo de glicose circulante no sangue, resultado de anormalidades na secreção e/ou ação da insulina. O extrato aquoso de *Vochysia rufa* (EAVR) tem sido utilizado popularmente para o tratamento do diabetes, no entanto, existem poucos estudos demonstrando o efeito dessa planta para o fígado. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos do EAVR no estresse oxidativo e alterações histopatológicas em fígado de ratos. Os animais foram divididos em seis grupos: (n = 10): não-diabético (ND) e diabético (DB) tratado via gavagem com o EAVR (500 mg/kg), glibenclamida (6mg/kg) e não tratados. O tratamento foi de 43 dias. Após o sacrifício, o fígado foi dissecado, pesado e armazenado a -80°C para avaliação do estresse oxidativo. E fixado em formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente processado para análise histológica. Os núcleos dos hepatócitos foram isolados e avaliados, por meio da citometria de fluxo, para determinação do índice de apoptose. No grupo DB houve aumento da atividade das enzimas SOD, GPx, e peroxidação lipídica (TBARS), e diminuição da atividade das enzimas CAT, GST e nos níveis de GSH, evidenciando a ocorrência do estresse oxidativo devido ao diabetes induzido por STZ. Por outro lado, no grupo DB-EAVR evidenciou-se uma restauração dos parâmetros analisados a níveis próximos do grupo ND. Não foram evidenciadas alterações histopatológicas significativas nos grupos estudados. No entanto, houve menor índice de apoptose nos grupos DB, ND-EAVR, DB-EAVR e DB-GB, enquanto que houve maior frequência de apoptose para o grupo ND-GB. Em conclusão, o tratamento dos animais diabéticos com o extrato aquoso de *Vochysia rufa* foi eficiente para restaurar os níveis normais das enzimas relacionadas à defesa antioxidante, bem como o extrato apresentou efeito antiapoptótico, porém não exibiu efeito significativo no peso corporal e na morfologia do fígado.

Palavras-chave: Diabetes. Estresse oxidativo. *Vochysia rufa*

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) consists of a group of syndromes characterized by hyperglycemia, altered lipid metabolism, carbohydrates, proteins, and an increased risk of complications. The aqueous extract of *Vochysia rufa* (AEVR), has been used to treat DM due to its hypoglycemic effect. Despite the popular use, there is a lack of information regarding the effect of AEVR in liver. The aim of this study was evaluate the effects of AEVR in oxidative stress, apoptosis index and morphological alterations in liver of rats. The animals were divided in six groups: non- (ND) and diabetic (DB) treated with AEVR (500mg/kg), glibenclamide (6mg/kg) and water. The rats were treated during 43 days. Liver was removed and stored at -80°C to oxidative stress analysis. And fixed in 10% phosphate-buffered formalin, than were processed, embedded in paraffin, sectioned at 4µm and stained with hematoxylin and eosin for histological examination under a light microscope. Nuclei of hepatic cells were isolated and analyzed by flow cytometry to determine the apoptotic index. The DB group shows an increase in activity of antioxidant enzymes GPx, SOD and lipid peroxidation (TBARS), and decrease in GHS, GST, CAT rates. On the other hand, the DB-AEVR group got this oxidative parameters restored to normal levels. Although, a decreased apoptotic index was observed in DB group, and an increased in ND-GB group. And was observed a reduction of apoptosis in this groups: ND-AEVR, DB-AEVR and DB-GB. Histological analysis demonstrated there wasn't difference in groups. According to experimental conditions, the AEVR was efficient to reduce oxidative stress induced by STZ, apparently has an anti-apoptotic effect, and weren't observed pathologic changes in hepatic tissue.

Keywords: Diabetes. Oxidative stress. *Vochysia rufa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo do dano celular induzido pela hiperglicemia-----	19
Figura 2. Esquema representativo das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema de defesa antioxidante dentro da célula -----	20
Figura 3. Esquema representativo dos passos seguidos para obtenção do gradiente de sacarose para o isolamento de núcleo dos hepatócitos -----	35
Figura 4. Fotomicrografias de fígado de ratos diabéticos e não diabéticos tratados e não tratados corados com HE. -----	43
Figura 5. Citometria de fluxo de núcleos apoptóticos de hepatócitos de ratos diabéticos e não diabéticos tratados e não tratados -----	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação dos níveis de glicose de ratos diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.----- 37

Tabela 2. Avaliação do peso inicial e final de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.----- 38

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros do estresse oxidativo no homogeneizado total de fígado de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.----- 40

Tabela 4. Avaliação da atividade das enzimas CAT, GPx e SOD na fração mitocondrial de fígado de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.----- 41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

AGEs – Produtos finais da glicação avançada (*Advanced glycation end products*)

ATP – Adenosina tri-fosfato

CAT - Catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

CuZnSOD – Superóxido dismutase citosólica

DB – Diabético

DHGNA – Doença hepática gordurosa não-alcólica

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido sesoxirribonucleico

DTNB – Ácido dinitrobenzóico

DTT - 1,4-ditiotreitol

EAVR – Extrato aquoso de *Vochysia rufa*

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

FRAP – Potencial antioxidante redutor Férrico (*Ferric Reducing Antioxidant Potential*)

GADPH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GB - Glibenclamida

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

GST – Glutathione-S-transferase

HE – Hematoxilina e Eosina

MDA - Malondialdeído

MnSOD – Superóxido dismutase mitocondrial

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato

ND – Não diabético

NFkB – Fator nuclear kB

p:v – Peso por volume

PARP - ADP-ribose polimerase

PKC – Proteína quinase C

PMSF - Fenilmetilsulfonilfluoreto

RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

S.E.M – Erro padrão da média (*Standard Error Mean*)

SOD – Superóxido dismutase

STZ - Estreptozotocina

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Método para avaliação de peroxidação lipídica

t-BuOOH - T-butil hidroperóxido

TCA – Ácido tricloroacético

TKM – Tampão composto por Tris, KCl e MgCl₂

TNB - Ácido tionitrobenzóico

TPTZ - 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina

U – Unidades de proteína

SUMÁRIO

1. Fundamentação teórica	14
1.1 <i>Diabetes mellitus</i>	14
1.2 Fígado, mitocôndria e diabetes.....	16
1.3 Diabetes e Estresse oxidativo	18
1.4 Defesas antioxidantes.....	19
1.5 <i>Vochysia rufa</i> Mart.	22
2. Objetivo geral	24
2.1 Objetivos específicos	24
3. Material e Métodos	25
3.1 Coleta e Preparo do Extrato	25
3.2 Indução de DM e tratamento.....	25
3.3 Coleta e processamento do fígado	26
3.4 Preparo do homogeneizado	27
3.5 Obtenção da fração mitocondrial	27
3.6 Dosagem de proteína	27
3.7 Avaliação do estresse oxidativo	28
3.7.1 Atividade da catalase.....	28
3.7.2 Atividade da glutathione peroxidase	28
3.7.3 Quantificação de glutathione reduzida	29
3.7.4 Atividade da glutathione S-transferase	30
3.7.5 Atividade da superóxido dismutase	30
3.7.6 Peroxidação lipídica	31
3.7.7 Medida da capacidade antioxidante total	32
3.7.8 Quantificação de sulfidril total.....	32
3.8 Preparo do material histológico.....	33
3.9 Avaliação de apoptose	33
3.10 Análise estatística	36
4. Resultados	37
4.1 Avaliação da glicemia e peso	37
4.2 Avaliação do estresse oxidativo	38
4.3 Análise Histopatológica	42

4.4 Avaliação de apoptose	44
5. Discussão	46
6. Conclusão	52
7. Referência Bibliográfica.....	53

Anexo

1. Fundamentação teórica

1.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica grave que acomete milhões de pessoas em todo o mundo, necessitando de tratamento intensivo e orientação médica adequada (Maia & Araújo, 2004). Esta doença apresenta proporções epidêmicas em todo o mundo, incluindo o Brasil e, desta forma, torna-se necessário implementar políticas de saúde pública que visem tanto a sua prevenção quanto a gestão (Levy, Cobas *et al.*, 2010).

Apesar dos grandes avanços realizados para a compreensão e tratamento do DM, complicações relacionadas estão aumentando ininterruptamente. Um comunicado da Organização Mundial da Saúde do dia 16 de maio de 2012 deu destaque ao crescente problema das doenças crônicas. E destaca que a prevalência média de DM no mundo está em 10% da população, embora muitas regiões, como as ilhas do Pacífico, esse valor chegue a 33%. Sem tratamento o DM é causa de doença cardiovascular, cegueira e insuficiência renal (WHO, 2012). No Brasil, baseado em estudos regionais de prevalência de DM tipo 2 e, de acordo com o CENSO IBGE 2010, a Sociedade Brasileira de Diabetes considera que 12.054.824 é o número estimado de diabéticos na população brasileira (Disponível em: <http://www.diabetes.org.br>).

A doença DM é caracterizada pelo aumento significativo de glicose circulante no sangue, resultado de anormalidades na secreção e/ou ação da insulina. O quadro hiperglicêmico, cronicamente instalado, desencadeia distúrbios no metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas, e ainda altera o balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes (Halliwell & Gutteridge, 2003).

Processos como glicação não-enzimática e a glicoxidação (Baynes & Thorpe, 1999) estão relacionados com o aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e

na formação de produtos finais da glicação avançada (AGES), os quais contribuem para a modificação irreversível de proteínas, DNA e lipídios, e com o aumento da peroxidação lipídica (Jennings, Jones *et al.*, 1987; Rosen, Nawroth *et al.*, 2001; Genet, Kale *et al.*, 2002; Siddiqui, Taha *et al.*, 2005). O desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes causa uma série de eventos danosos às funções celulares normais (Poornima, Parikh *et al.*, 2006).

Uma abordagem terapêutica para o tratamento do DM é diminuir a hiperglicemia pós-prandial. Tal efeito é obtido através do retardo da absorção de glicose por meio da inibição das enzimas carboidrato-hidrolizantes, alfa-amilase e alfa-glucosidase no aparelho digestivo (Ali, Houghton *et al.*, 2006). Os medicamentos de uso oral utilizados no tratamento do DM são substâncias derivadas das sulfoniluréias, das biguanidas, dos inibidores das alfa-glicosidases (acarbose), das glitazonas (thi-azolidinedionas) e das chamadas metiglinidas, substâncias derivadas do ácido benzóico ou da fenilalanina (Costa & Almeida, 2004). A glibenclamida é um antidiabético oral pertencente ao grupo farmacológico das sulfoniluréias de segunda geração, que são agentes hipoglicemiantes orais que estimulam a secreção de insulina, indicada no DM tipo 2 como a primeira opção nos indivíduos não obesos que não alcançaram níveis glicêmicos desejáveis após a adoção das medidas dietéticas e da prática regular de atividade física (Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/hiperdia/glibenclamida.php>).

Existem substâncias extraídas de plantas que são capazes de reduzir o nível de glicose no sangue (Negri, 2005). Um grande número de espécies de plantas é usado experimentalmente para tratar os sintomas do DM, sobretudo do tipo 2 (Oliveira, Dos Santos *et al.*, 2008; Celikler, Tas *et al.*, 2009; Gupta, Sharmaa *et al.*, 2009; Hsu, Lee *et al.*, 2009; Hamza, Berke *et al.*, 2010; Islam, 2011; Díaz-Flores, Angeles-Mejia *et al.*, 2012), e a distância filogenética neste grupo de plantas é um forte indicativo da natureza

diversa de seus constituintes, dentre esses, os polissacarídeos complexos que, possivelmente, envolvem o estímulo da utilização da glicose no fígado e tecidos periféricos por meio de enzimas-chave que participam do metabolismo da glicose, como glicoquinase, hexoquinase e glicose-6-fosfatase (De Paula, Sousa *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos apontam a relação do diabetes com alterações hepáticas (Paes, Gazoni *et al.*, 2007; Hamden, Carreau *et al.*, 2008), bem como os efeitos benéficos de plantas contra os danos hepáticos induzidos pela hiperglicemia (Ferreira, Gris *et al.*, 2010; Rodrigues, Marcolin *et al.*, 2010, Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012; Rodrigues, Di Naso *et al.*, 2012).

Bem como, vários estudos demonstram os efeitos benéficos de plantas medicinais na melhora do quadro diabético (Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012; Rodrigues, Di Naso *et al.*, 2012), devido às propriedades antioxidantes de seus constituintes (Torres, Faini *et al.*, 2006; Olalyea & Rocha, 2007; Vicentino & Menezes, 2007; Dornas, Oliveira *et al.*, 2009).

1.2 Fígado, mitocôndria e diabetes

Designado como órgão detoxificante, o fígado desempenha uma função central na homeostase metabólica e na síntese, metabolismo, armazenamento e redistribuição de carboidratos, proteínas e lipídeos (Bechmann, Hannivoort *et al.*, 2012). Portanto, é um órgão multifuncional que desempenha funções essenciais no metabolismo: biotransformação, secreção e excreção. Esses processos consomem energia, então o tecido hepático é altamente dependente de oxigênio, o que o torna um alvo dos efeitos tóxicos de diversos compostos xenobióticos (Cvervinková, Lotková *et al.*, 2007).

Alterações no metabolismo da glicose no fígado estão relacionadas com o DM; como resultado da disfunção de células- β e devido à secreção inadequada de insulina, os

níveis de glicose pós-prandial e, em seguida, de jejum aumentam devido à supressão incompleta da produção de glicose hepática e diminuição da eficiência de captação de glicose do fígado e músculo (Kahn, H μ Ll & Utzschneider, 2006). Além disso, o DM tipo 2 está associado com a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Esta desordem hepática, como uma complicação diabética, é ocasionada tanto pela hiperglicemia induzida pela resistência à insulina, como também pelo estresse oxidativo (Park, Noh *et al.*, 2012). Bem como, Rossetti, Giaccari e colaboradores (1993) demonstraram que diversas enzimas hepáticas estão defeituosas no fígado diabético.

A mitocôndria é a organela responsável pela produção da maior parte da Adenosina Trifosfato (ATP) por meio da fosforilação oxidativa nas células eucarióticas, e está envolvida em muitos processos essenciais para a sobrevivência e função celular (Dey & Swaminathan, 2010). O sistema de fosforilação oxidativa mitocondrial é composto por cinco complexos de proteína. O piruvato derivado da glicólise é transportado para dentro das mitocôndrias, onde é oxidado pelo ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) para gerar NADH. Os complexos I e II recolhem elétrons de NADH e FADH₂, respectivamente, e passam os elétrons para a ubiquinona, que é oxidada pela ubiquinona citocromo-c oxidorreductase (complexo III) e citocromo-c oxidase (completo IV). Elétrons resultantes da oxidação de substratos são canalizados através dos transportadores redox da cadeia respiratória (complexos I, III, e IV) para o último receptor de elétrons, o oxigênio molecular (Rolo & Palmeira, 2006).

Dey & Swaminathan (2010) afirmam que a disfunção mitocondrial no DM evidenciada em diversos trabalhos (Abdul Ghani & DeFronzo, 2008; Mantena, King *et al.*, 2008; Boudierba, Sanz *et al.*, 2012) é uma consequência da exposição dessa organela às espécies reativas. A disfunção mitocondrial no fígado ocasionada pela hiperglicemia ocorre através de diversos mecanismos, tais como diminuição da fosforilação oxidativa

mitocondrial, diminuição do consumo de oxigênio, aumento da formação de proteínas carboniladas, peroxidação lipídica, estresse nitrosativo, e mudanças na ultraestrutura tais como a fragmentação e a hipertrofia com aumento do número de cristas anormais (Dey & Swaminathan, 2010). A mitocôndria é o principal local da célula para a produção de EROS, sendo também o principal alvo do dano oxidativo, e por isso, essa organela é equipada com vários mecanismos de defesas antioxidantes (Jackson, Papa *et al.*, 2002).

1.3 Diabetes e Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons (Reis, Veloso *et al.*, 2008).

A hiperglicemia causa danos teciduais por meio de cinco mecanismos, que estão esquematizados na **Figura 1**: 1) aumento do fluxo de glicose e outros açúcares através da via dos polióis; 2) aumento da produção intracelular de produtos finais da glicação avançada (na sigla em inglês AGEs – *advanced glycation end products*); 3) aumento da expressão de receptores de AGEs e ativação de seus ligantes – como os receptores para produtos de glicação avançados (RAGE); 4) ativação da proteína cinase C (PKC) e aumento da expressão de NF- κ B; e 5) ativação da via das hexosaminas (Giacco & Brownlee, 2010).

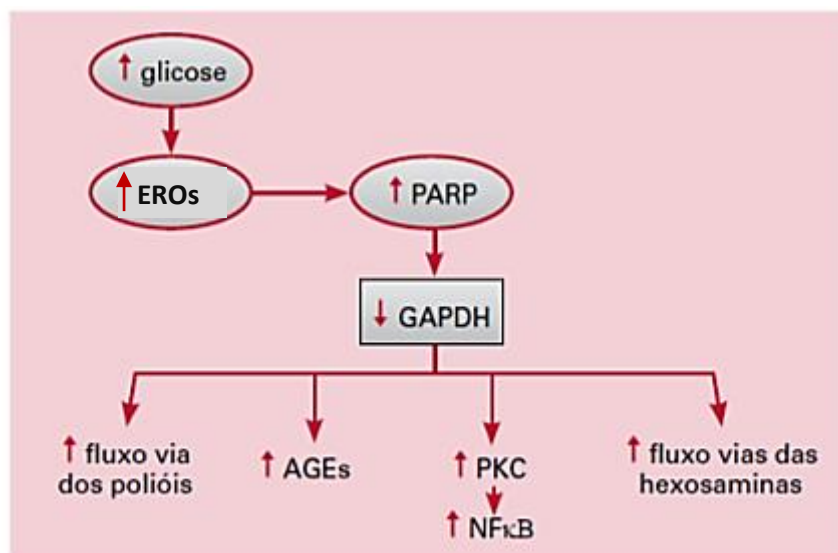


Figura 1. Mecanismo do dano celular induzido pela hiperglicemia. EROS = espécies reativas de oxigênio/ PARP: ADP-ribose polimerase; GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; AGEs = produtos avançados de glicosilação não-enzimática; PKC = proteína quinase C; NFκB = fator nuclear kB. Fonte: Reis, Veloso *et al.*, 2008.

Diversos trabalhos indicam que esses cinco mecanismos são ativados pelo aumento de produção mitocondrial de EROS. Além disso, é evidenciado que no DM o estresse oxidativo coexiste com a redução na capacidade antioxidante do organismo, a qual pode aumentar os efeitos deletérios de EROS (Dornas, Oliveira *et al.*, 2009). Nessas condições patológicas o estresse oxidativo pode modificar irreversivelmente macromoléculas biológicas, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (Reis, Veloso *et al.*, 2008).

1.4 Defesas antioxidantes

No processo de respiração celular, após quatro ciclos de redução, o oxigênio é convertido em água. No entanto, durante o metabolismo normal, a redução parcial do oxigênio produz espécies reativas, como o ânion superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Marí, Morales *et al.*, 2012). Normalmente, apenas 0,1% do total de

oxigênio consumido são retirados da cadeia respiratória para gerar EROS (Rolo & Palmeira, 2006).

Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, esquematizado na **Figura 2**, que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona redutase (GR) e pela GPx, entre outros (Ferreira & Matsubara, 1997).

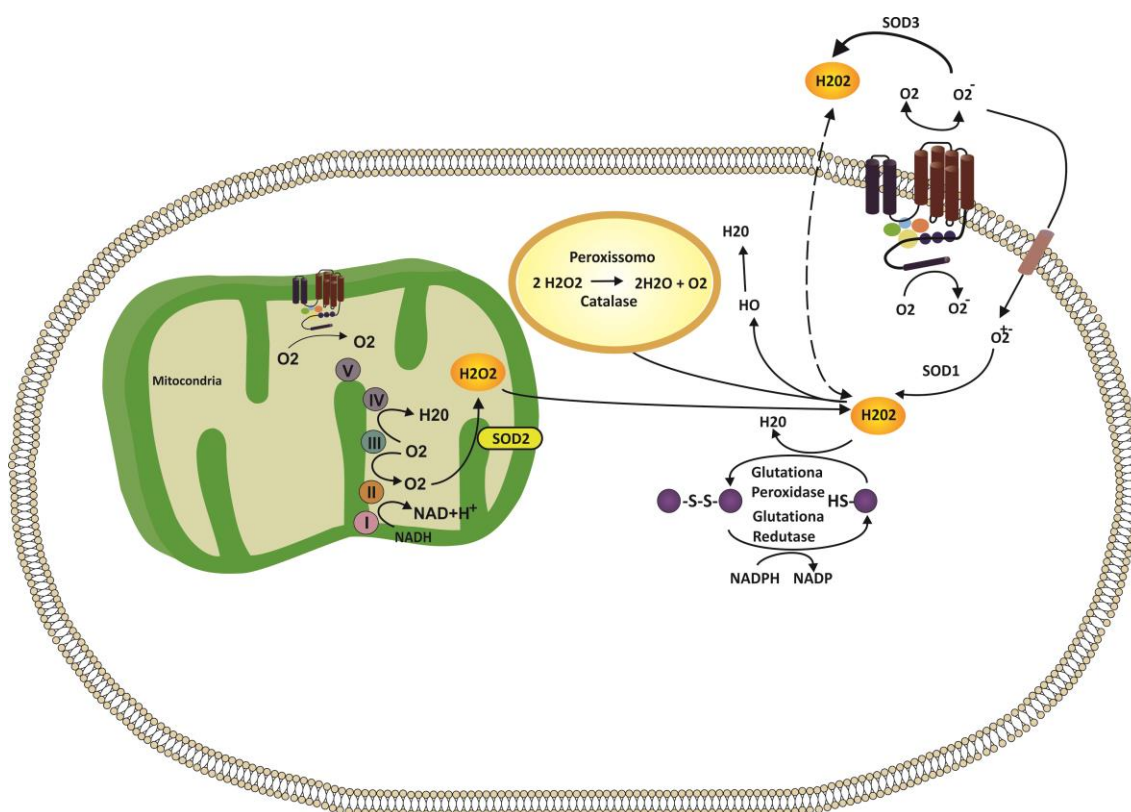


Figura 2. Esquema representativo das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROS) e o sistema de defesa antioxidante dentro da célula. EROS são geradas pela cadeia transportadora de elétrons e são neutralizados pelos antioxidantes, incluindo a família de proteínas SOD, CAT e o sistema da GSH. Adaptado de Shao, Oka *et al.*, 2012.

O grupo de oxido-redutases chamado de SODs catalisa a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e água. Nos mamíferos existem três isoformas de SOD (SOD1 – CuZnSOD, SOD2 – MnSOD e SOD3), originadas por genes diferentes e localizadas em regiões subcelulares distintas, no entanto, catalisam a mesma reação. A especificidade da localização subcelular é importante para a compartimentalização da sinalização redox. A SOD1 está localizada no citosol e é uma homodímero de 32KDa. A SOD2 é um homotetrâmero de 96KDa que está localizado na matriz mitocondrial, sendo produzida no citosol e direcionada para a mitocôndria por um sinal peptídico. A SOD3 é a SOD extracelular, presente na matriz extracelular, superfície celular e líquido extracelular (Fukai & Ushio-Fukai, 2011). De acordo com Marí, Morales e colaboradores (2012) na mitocôndria, a primeira linha de defesa antioxidante é garantida pela SOD2 cuja função é dismutar o O_2^- formando o peróxido de hidrogênio.

A CAT é uma enzima produzida pelo peroxissomo, cuja função é converter o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A maioria dessas enzimas possui um grupo heme (Fe^{+3} - protoporfirina) e ligado a cada subunidade uma molécula de NADPH, que auxilia na estabilização da enzima.

A enzima GPx converte o peróxido de hidrogênio em água, oxidando a GSH ao seu correspondente dissulfeto GSSG. GSH é regenerada pela enzima glutathione redutase por intermédio da oxidação de NADPH. As enzimas GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros (outros complexos também podem existir), apresentando dois sítios ativos por dímero cujas atividades são independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de duas regiões de ligação, um para a GSH que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação com menor especificidade para os eletrófilos (Huber & Almeida, 2008). A GSH é um tripeptídeo (*L*- γ -glutamil-*L*-cisteinilglicina) que exerce funções essenciais na célula, destacando-se

a atuação como cofator da família de enzimas GPx, em que desempenha papel protetor contra o estresse oxidativo, com sua oxidação a dissulfeto da glutathione. A GSH é o único tiol não proteico presente em espécies aeróbias e seu papel intracelular antioxidante inclui a desintoxicação de xenobióticos e de EROs (Vasconcelos, Goulart *et al.*, 2007).

Os grupamentos sulfidríla são compostos que possuem grande importância no sistema antioxidante por oferecerem suas ligações (–SH) a Glutathione (GSH) e também na atenuação das respostas de estresse oxidativo.

1.5 *Vochysia rufa* Mart.

O Cerrado brasileiro possui grande potencial medicinal, já que é detentor de uma grande diversidade biológica e taxonômica apresentando grande número de compostos. Devido a essa grande biodiversidade, várias plantas são comumente usadas como remédios naturais por pessoas que habitam a área do Cerrado para tratamento de várias doenças.

A família Vochysiaceae abrange seis gêneros e cerca de 200 espécies, neotropicais, com poucos representantes em regiões subtropicais. O único gênero não americano é *Erismadelphus*, que ocorre na África tropical ocidental. Os cinco gêneros americanos estão bem representados na flora brasileira, tendo seus centros de diversidade situados nas regiões Guiano-Amazônica, Planalto Central e na Floresta Atlântica. A representação da família Vochysiaceae é significativa nos diferentes ecossistemas brasileiros e os seus exemplares tendem a se distribuir de forma agrupada (Vianna, 2006).

O gênero *Vochysia* Aubl compreende cerca de 100 espécies, caracterizadas por serem grandes árvores e arbustos que ocorrem ao longo da América Tropical do México

ao Peru. Várias destas espécies são utilizadas por comunidades indígenas na América do Sul para o tratamento de reações inflamatórias (Schultes & Raffauf, 1990), devido à presença do ácido betulínico, encontrado em diversas espécies de *Vochysia* (Weniger, Lostein *et al.*, 2005). Espécies desse gênero são usadas também no tratamento de infecções cutâneas e para aliviar doenças respiratórias, como asma e congestão pulmonar (Schultes & Raffauf, 1990). Além disso, o extrato metanólico de folhas de *Vochysia tucanorum* demonstrou atividade antiulcerogênica gástrica devido à presença de triterpenos pentacíclicos como o ácido betulínico, ácido epi-betulínico, eritrodiol e misturas de derivados ursólicos e oleanólicos (Gomes, Bonamin *et al.*, 2009).

Trabalhos fitoquímicos realizados com espécies do gênero *Vochysia* levaram ao isolamento de polifenóis e triterpenos (Zucaro, Compagnonea *et al.*, 2000). O extrato aquoso da casca de *Vochysia rufa* contém compostos fenólicos, cumarinas, heterosídeos antraquinônicos, saponinas e triterpenóides (Silva, 2009). Em estudo realizado com moradores da cidade de Alto Paraíso de Goiás/GO, a planta conhecida como “quina doce” (*Vochysia rufa*) é utilizada no tratamento de resfriados e como vermífuga (Silva, 2009). Entretanto, não há muitos trabalhos que comprovem cientificamente suas atividades farmacológicas.

Por meio do relato de uma experiência médica, foi possível o conhecimento sobre o uso popular da quina-doce em Uberlândia-MG, para o tratamento do DM, pois apresenta efeito hipoglicemiante. Desse modo, fez-se necessário o estudo para elucidar os efeitos do extrato aquoso de *Vochysia rufa* no tecido hepático.

2. Objetivo geral

Avaliar as alterações histopatológicas, bem como sobre o estresse oxidativo do tecido e em fração mitocondrial de células do fígado de ratos não diabéticos e diabéticos induzidos por estreptozotocina e tratados com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar as alterações morfológicas do tecido hepático dos diferentes grupos estudados;
- Avaliar o índice de células apoptóticas por meio da citometria de fluxo;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) em frações mitocondriais e homogeneizado total do tecido hepático;
- Avaliar a atividade da glutathione-S-transferase (GST) no tecido hepático;
- Quantificar os grupamentos sulfidrilas totais do fígado;
- Avaliar a lipoperoxidação mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta e Preparo do Extrato

Os espécimes coletados de *Vochysia rufa* Mart. para a preparação do extrato foram oriundos do município de Abadia dos Dourados, Minas Gerais, Brasil (latitude 18° 27' 50.5'' e longitude 47° 23' 37.2''). Para confirmação da espécie, um exemplar foi identificado no *Herbarium uberlandensis* e depositado em exsicata, sob o registro 58.888.

Os galhos dos espécimes foram coletados no período de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010. As cascas foram retiradas e cortadas, sendo posteriormente desidratadas em estufa a 40°C aproximadamente, durante 24h. Depois de retiradas da estufa, as cascas foram trituradas, resultando em um pó fino, e armazenado em local apropriado, protegido da luminosidade.

Para a obtenção do extrato, 200g do pó da casca foram macerado com 1L de água (1p:5v) durante 24h, conforme o uso popular. A mistura foi filtrada por meio de filtro de papel, e posteriormente centrifugada, durante 15min a 4°C e 4.400 rpm. O sobrenadante foi colocado em tubos e congelado e liofilizado.

3.2 Indução de DM e tratamento

O protocolo experimental foi desenvolvido com base nas normas do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia. Protocolo número N° 060/10 (Anexo). Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso entre 200 e 300g, os quais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada e ciclos de claro/escuro de 12h durante todo o tratamento.

O DM foi induzido por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) na dose de 40mg/kg de peso corporal, os animais do grupo controle receberam uma dosagem de

salina, por injeção intraperitoneal, com a finalidade de submetê-los a mesmo estresse dos grupos tratados. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio 0,01M, pH 4,5. Após 10 dias da administração os animais com glicemia acima de 250mg/dL foram considerados diabéticos.

Foram utilizados 60 animais divididos em 6 grupos, totalizando 10 animais por grupo: controle não diabético (ND); controle diabético (DB); não diabético tratado com extrato aquoso de *Vochysia rufa* (ND-EAVR); não diabético tratado com glibenclamida (ND-GB); diabético tratado com EAVR (DB-EAVR) e diabético tratado com glibenclamida (DB-GB). A concentração do EAVR foi de 500mg/kg e a de glibenclamida foi de 6mg/kg. Ambos foram diluídos em água e administrados aos animais via gavagem no período da tarde, durante 43 dias. Os controles receberam água por gavagem. O peso e a glicemia foram monitorados periodicamente. Para a avaliação da glicemia, uma gota de sangue foi coletada da cauda dos animais e colocada em tiras de glicose as quais foram lidas no glicosímetro.

3.3 Coleta e processamento do fígado

Após 43 dias de tratamento os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina e cloridrato de xilasina, numa proporção de 100mg/kg de cetamina para 50mg/kg de xilasina. Os anestésicos foram administrados intraperitonealmente na região abdominal.

Os fígados foram dissecados, lavados em solução salina, pesado e congelado a -80°C para as análises bioquímicas posteriores, ou fixado em formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente incluído em parafina para análise histológica.

3.4 Preparo do homogeneizado

A homogeneização do tecido foi feita em homogeneizador para tecidos do tipo *Potter*. O fígado foi seccionado e utilizou-se 1g de tecido para 4 mL de tampão de homogeneização (tampão fosfato 20mM, pH 7,4) com inibidores de proteases PMSF (0,5mM), pefabloc (0,1mM), aprotinina, DTT (2mM) e benzamidina (1mM). O homogeneizado foi centrifugado a 800 x g, a 4°C, por 10 min, o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos a -80°C para posterior análise.

3.5 Obtenção da fração mitocondrial

O fígado foi seccionado e utilizou-se 1g de tecido para 4mL de tampão de homogeneização (pH 7,4): sacarose (0,25M), HEPES (20mM) e EDTA (1mM) com inibidores de proteases PMSF (0,5mM), pefabloc (0,1mM), aprotinina, DTT (2mM) e benzamidina (1mM).

O homogeneizado foi filtrado em gaze e centrifugado a 800 x g, a 4°C, por 10 min. O sobrenadante foi retirado e centrifugado novamente a 10.000 x g, a 4°C, durante 10 min para obtenção da fração mitocondrial. O precipitado mitocondrial foi ressuspenso no mesmo tampão utilizado para homogeneização e armazenado em microtubos a -80°C para posterior análise.

3.6 Dosagem de proteína

A concentração de proteína total dos homogeneizados de fígado e das frações mitocondriais foi determinada pelo método de Bradford (1976). Como padrão, foi utilizada uma solução de soro albumina bovina em volume crescente de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 e 100µL, os quais foram completados a 100µL com água. Foram adicionados 200µL da solução de Bradford. A leitura foi feita em microplaca a 595nm.

Para o teste, 10µL da amostra foram pipetados na microplaca, em duplicata, e completado com 90µL de água, 200µL da solução de Bradford foi adicionado. Após 10 minutos, a leitura foi realizada.

3.7 Avaliação do estresse oxidativo

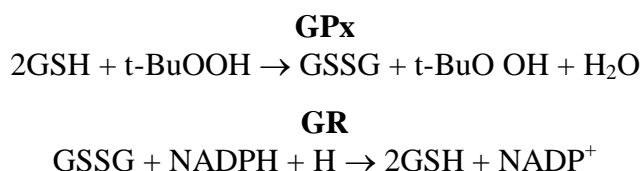
3.7.1 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Aebi (1984). Essa enzima converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. O método consiste na avaliação do decaimento no consumo de peróxido de hidrogênio que é lido espectrofotometricamente a 240 nm.

A solução de trabalho é composta por tampão fosfato de sódio 50mM acrescido de 340µL de peróxido de hidrogênio (30%). Na cubeta de quartzo foram adicionados 1000µL da solução de trabalho e 10µL da amostra diluída 100x. A reação foi lida durante 30s, com leituras nos seguintes intervalos: 0, 15 e 30s, realizadas em duplicata. Os resultados foram expressos em atividade da enzima/ unidade de proteína/segundo.

3.7.2 Atividade da glutathiona peroxidase

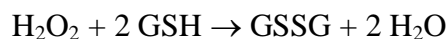
A GPx dismuta o t-butil hidroperóxido (t-BuOOH) do ensaio, gerando uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-GS), que por sua vez volta ao estado reduzido (2 GSH), pela ação da Glutathiona Redutase (GR), mediante a oxidação de NADPH. Assim, o ensaio é uma medida que consiste em registrar a diminuição de NADPH (Flohe & Gunzler, 1984), conforme esquema demonstrado abaixo:



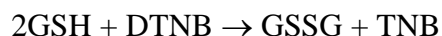
A medida da atividade da enzima é feita em espectrofotômetro a 340 nm. Em uma cubeta de quartzo foram colocados 500µL do tampão fosfato (0,1M pH 7,0), 100µL da amostra diluída 20x, 100µL de glutathione redutase (0,24 U/mL) e 100µL de glutathione reduzida (GSH). Essa solução foi incubada durante 10 minutos, após, foram adicionados 100µL de NADPH e uma leitura foi realizada. Após 3 minutos foi realizada nova leitura para monitorar o consumo independente de hidroperóxido. Então, foi adicionado 100µL de t-BuOOH 12mM, e o decaimento da absorbância foi monitorado por 5 min. As leituras foram realizadas em duplicata. Para o cálculo foi considerada a última leitura realizada. O resultado foi dado em mmol/min/mL.

3.7.3 Quantificação de glutathione reduzida

A GSH é um tripeptídeo de baixo peso molecular que contém um tiol em sua molécula, e é o substrato para a enzima GPx.



O princípio da técnica, segundo Beutler, Duron & Kelly (1963), consiste na reatividade da GSH com o ácido dinitrobenzóico (DTNB) formando um tiolato (TNB) de cor amarelada (quanto maior a presença de GSH, mais acentuada a cor), mensurável a 412 nm.

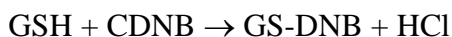


O procedimento consistiu em precipitar o homogeneizado com ácido tricloroacético (TCA) 12% em uma proporção de 1:1. O material foi colocado no freezer durante 10 min para choque térmico e posteriormente centrifugado a 10.000 x g, a 4°C, durante 10 min. Para a reação foram colocados 800µL de tampão fosfato, 50µL

da amostra precipitada com TCA 12% e 50 μ L de DTNB. Foram pipetados 300 μ L dessa solução que então foi lida em duplicata na microplaca. O resultado foi expresso em mM.

3.7.4 Atividade da glutathiona S-transferase

O método utilizado foi o descrito por Habig, Pabst & Jakoby (1974). A GST da amostra catalisa a formação de tioésteres pela adição de GSH ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB).



Em uma cubeta de quartzo foram colocados 1000 μ L de tampão fosfato 0,1M, 20 μ L de CDBN 0,1M, 20 μ L de GSH 0,1M e 20 μ L do homogeneizado diluído 20x. Após um minuto, foi realizada uma leitura da reação a 340 nm. As leituras foram feitas em duplicata. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.7.5 Atividade da superóxido dismutase

O princípio da técnica, descrita por Boveris (1984), consiste na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela enzima SOD presente na amostra. Considerando que a adrenalina permanece estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação de adrenocromo (responsável pela coloração roseada), a atividade da SOD foi medida espectrofotometricamente seguindo a troca de absorbância de adrenalina a 480nm, quando foi observado um pico de absorbância entre leituras periódicas de 30 em 30s com tempo médio de leitura entre 4 e 7 minutos.

Foi preparada uma solução de tampão glicina 50mM, adrenalina 60mM, catalase 10uM e amostra diluída 100x. A leitura foi realizada em microplaca com volumes

diferentes da amostra (5, 10, 15, 20 e 30 μ L) em duplicatas. Foram pipetados então, volumes diferentes de tampão glicina para cada volume de amostra (185, 180, 175, 170 e 160 μ L), e 5 μ L de catalase e 5 μ L de adrenalina foram adicionados em todos os poços. Para a curva de adrenalina, foram utilizados 5 μ L de adrenalina, 5 μ L de catalase e 190 μ L de tampão glicina, em quadruplicatas. O resultado foi expresso em U SOD/mg proteína.

3.7.6 Peroxidação lipídica

Esse método utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos foi descrito por Hermes-Lima, Willmore, & Storey (1995). O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação do subproduto da lipoperoxidação - malondialdeído (MDA), que é uma substância reativa ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formada durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto de coloração rósea que é mensurado a 532 nm.

A curva padrão foi realizada utilizando-se MDA como controle positivo, em concentrações crescentes (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 50 e 100 μ mol).

Foram precipitados 200 μ L da amostra com TCA 10%, que após ser mantido em geladeira durante 15 min, foi centrifugado a 2.200 x g, a 4°C, por 15 min. Então, 300 μ L do sobrenadante foram recolhidos e adicionados a 300 μ L de TBA. Os microtubos foram aquecidos a 95°C durante 2h. Posteriormente, 150 μ L das amostras foram pipetados na microplaca, em duplicata, para a leitura. O resultado foi expresso em mmol de MDA/mg de proteína.

3.7.7 Medida da capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante foi determinada através do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP). O FRAP é um teste de medida direta de “poder antioxidante total”, realizado em pH baixo em que os antioxidantes presentes no plasma reduzem Fe^{+3} a Fe^{+2} , o qual é quelado pela 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ, de coloração azul intensa, cuja formação pode ser monitorada a 593 nm (Benzie & Strains, 1999).

Para a determinação da capacidade antioxidante total foi utilizada uma curva padrão de Trolox com concentrações crescentes de 50, 100, 200, 400, 800 e 1000 μM .

Para o preparo do reagente de trabalho foram misturados tampão acetato de sódio (300mM) pH 3,6, TPTZ 10mM e cloreto férrico 20mM em uma proporção de 10:1:1. Na microplaca foram pipetados 250 μL do reagente de trabalho, 10 μL do homogeneizado e 25 μL de água destilada. A microplaca foi incubada a 37°C durante 6 min e uma leitura foi realizada em espectrofotômetro. A microplaca foi incubada novamente a 37°C por mais 4 min e uma nova leitura foi realizada. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/Trolox/L}$.

3.7.8 Quantificação de sulfidril total

No ensaio, o DTNB reage com a sulfidril livre da cadeia lateral da cisteína para formar uma ligação S-S entre a proteína e um ácido tionitrobenzóico (TNB).

Foi utilizada uma curva padrão com acetil-cisteína, a qual foi preparada em diluição seriada com os seguintes intervalos de concentração: 1000, 500, 250, 125, 62,5, e 31,25 μM .

Foram centrifugados a 3000 x g, a 4°C, durante 15 min: 20 μL de amostra ou padrão, 75 μL de tampão de diluição (Tris 30mM e EDTA 3mM), 400 μL de metanol e

25µL de reagente de cor DTNB. Foram retirados 90µL do sobrenadante e aplicados em duplicata na microplaca. A leitura foi realizada a 412 nm. Os resultados foram expressos em µM/µg de proteína.

3.8 Preparo do material histológico

O fígado foi seccionado e fixado em formaldeído tamponado a 10% e posteriormente incluído em parafina. Foram feitos cortes histológicos de 4µm em micrótomo, os quais foram corados com HE. Padronizou-se o uso da região central do lobo esquerdo do fígado.

No processo de coloração, os cortes passaram por duas etapas distintas: 1) processo de hidratação (ou desparafinização) em banhos sucessivos de xilol, acrescido de banhos decrescentes de álcool etílico: 95%, 85% e 70%. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em água corrente por 20 min e coradas com hematoxilina, deixadas mais 20 min em água corrente e coradas com eosina; e 2) desidratação (diafanização), em banhos crescentes de álcool etílico: 70%, 85% e 95%, e posteriormente em banhos sucessivos de xilol, e por fim, as lâminas foram montadas com lamínula e entelan.

3.9 Avaliação de apoptose

Para avaliação da frequência de apoptose, os núcleos dos hepatócitos foram isolados de acordo com o método descrito por Blobel & Potter (1966). Para a homogeneização, utilizou-se o homogeneizador de tecidos do tipo *Potter*, na concentração de 1g de tecido para 8 mL de tampão de homogeneização TKM (Tris 0,02M, KCl 0,025M e MgCl₂ 0,005M) com inibidor de proteases (PMSF). 8 mL de homogeneizado de fígado (volume final) foram adicionados a 16mL de tampão de

homogeneização TKM acrescido de sacarose 0,25M. O homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gaze.

O isolamento do núcleo de hepatócito foi realizado por meio da centrifugação em gradiente de sacarose. O esquema da **Figura 3** apresenta de forma sucinta os passos seguidos. O gradiente de sacarose foi preparado com uma solução de 0,25M e outra de 2,3M. A concentração de sacarose a 0,25M foi usada para manter a osmolaridade do meio, e a sacarose 2,3M garante a passagem somente dos núcleos. A proporção do gradiente no tubo foi de 1/ 2 / 1 (homogeneizado / menos denso (sacarose) / mais denso(sacarose)). Foram adicionados 2,75mL da solução do homogeneizado nos tubos para centrifugar e 5,5 mL de sacarose na concentração 2,3M. A mistura de 1 volume de 0,25M (sacarose contida na solução de homogeneização) mais 2 volumes de 2,3M de sacarose, resultou em uma concentração de 1,65M de sacarose. Então, adicionou-se novamente 2,75mL da solução de 2,3M de sacarose no fundo do tubo para formar o gradiente, mantendo a proporção de 1 / 2 / 1.

As amostras foram ultracentrifugadas a 124.000 x g, a 4°C, durante 30 min. O sobrenadante foi desprezado e a fração dos núcleos foi seca a temperatura ambiente. A fração foi ressuspensa em tampão TKM contendo 0,5% de triton X-100. As amostras foram centrifugadas novamente a 800 x g, a 4°C, por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os núcleos ressuspensos em tampão contendo glicerol 30%, os quais foram armazenados a -20°C.

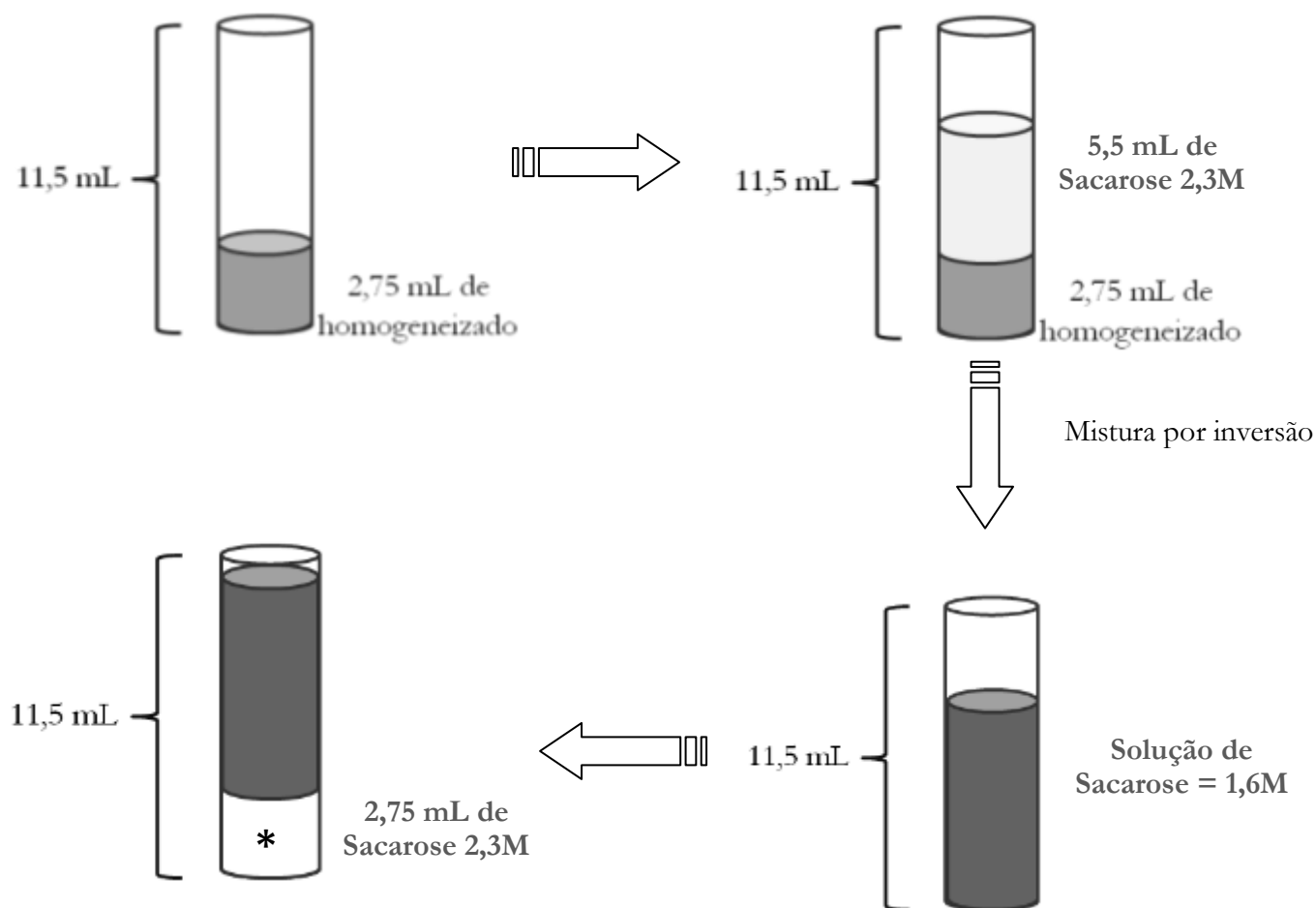


Figura 3. Esquema representativo dos passos seguidos para obtenção do gradiente de sacarose para o isolamento de núcleo dos hepatóticos. * indica a região do gradiente onde os núcleos estão sedimentados após a ultracentrifugação.

Os núcleos foram corados com iodeto de propídio na proporção de 1 μ L de iodeto de propídio para 500 μ L de amostra de núcleo diluída 10x. O iodeto de propídio é um agente que intercala na molécula de DNA (corante de ácidos nucleicos). Os núcleos foram submetidos à análise em citômetro de fluxo (BD Accuri C6), e para a análise dos resultados, utilizou-se o *software* FlowJo.

3.10 Análise estatística

Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados utilizando-se o teste t de *Student* através do *software* SigmaStat 3.5, os quais foram considerados estatisticamente diferentes quando a comparação apresentou significância com um $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Avaliação da glicemia e peso

Os resultados da avaliação da glicemia inicial e final estão mostrados na **Tabela**

1. Houve diferença significativa entre os grupos controle DB e ND, evidenciado pelo aumento da glicemia indicando a ocorrência do diabetes, por meio da indução por STZ. Ao final do tratamento, observou-se que os animais diabéticos tratados com GB quando comparado com o DB.

Tabela 1. Avaliação dos níveis de glicose de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.

	Glicemia inicial (mg/dL)	Glicemia final (mg/dL)
ND	82,2 ± 1,1	47,4 ± 1,9
DB	352,2 ± 23,5	535,0 ± 43,0 ^{*a}
DB-EAVR	488,6 ± 36,9	314,6 ± 87,3
DB-GB	326,6 ± 29,4	97,0 ± 19,0 ^{*b}

Os dados representam a média ± S.E.M para 5 animais. Os valores são estatisticamente significantes para ^{*}p < 0,01, ^a comparado com o controle não diabético (ND); ^b comparado com o controle diabético (DB). . ND – animais não diabéticos. DB – animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. EAVR animais tratados com extrato aquoso de *Vochysia rufa*. GB animais tratados com glibenclamida.

O peso dos animais também foi avaliado periodicamente durante o tratamento, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos no período inicial e final, exceto para o grupo DB que reduziu o peso no final do experimento. Esses resultados são mostrados na **Tabela 2**, assim como os resultados para os pesos total e relativo do fígado. Os grupos ND-GB e ND-EAVR apresentam menor peso total e peso relativo do fígado, quando comparados com o grupo ND. No grupo DB o peso do fígado foi menor, no entanto, esse grupo apresentou maior peso relativo do fígado. No grupo DB-GB foi evidenciado maior peso do fígado.

Tabela 2. Avaliação do peso inicial e final de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.

	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso fígado (g)	Peso relativo fígado%
ND	264,6 ± 0,8	356,9 ± 10,5	11,7 ± 0,5	3,3 ± 0,1
ND-EAVR	268,7 ± 3,85	350,5 ± 9,4	9,9 ± 0,3 ^{**a}	2,9 ± 0,1 ^{**a}
ND-GB	269,3 ± 3,8	355,5 ± 8,9	10,1 ± 0,3 ^{**a}	2,8 ± 0,1 ^{**a}
DB	237,0 ± 8,1	225,9 ± 8,4 ^{*a}	9,0 ± 0,2 ^{*a}	4,0 ± 0,1 ^{*a}
DB-EAVR	224,8 ± 10,9	220,2 ± 10,0	9,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2
DB-GB	231,7 ± 9,9	249,0 ± 14,6	12,3 ± 0,7 ^{*b}	4,9 ± 0,4

Os dados são representados como média ± S.E.M.; n = 10; * p < 0,001. **p < 0,05. ^aquando comparado com controle não diabético. ^b grupo diabético tratado quando comparado com o controle diabético. ND – animais não diabéticos. DB – animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. EAVR animais tratados com extrato aquoso de *Vochysia rufa*. GB animais tratados com glibenclamida.

4.2 Avaliação do estresse oxidativo

Os resultados da avaliação do estresse oxidativo no homogeneizado total do fígado estão apresentados na **Tabela 3**. Para a dosagem de CAT não houve diferença significativa para os grupos DB-EAVR e DB-GB quando comparados com o grupo DB, no entanto, houve aumento significativo para o grupo ND-EAVR quando comparado com o grupo ND. Em relação a atividade de GPx houve aumento significativo no controle diabético, mas, houve diminuição da atividade dessa enzima nos grupos diabéticos tratados tanto com GB quanto com EAVR. Em relação a GPx nos animais dos grupos não diabéticos, houve aumento significativo do grupo tratado com EAVR.

Em relação aos níveis de GSH, houve aumento significativo para os grupos ND-EAVR e DB-EAVR. O grupo DB reduziu significativamente os níveis de GSH quando comparado com o grupo ND. O grupos DB reduziu significativamente a atividade da enzima GST. Entretanto, o grupos DB-EVAR aumentou significativamente a atividade da GST e não houve alteração no grupo ND-EAVR. Os grupos DB e ND-EAVR aumentaram significativamente a atividade da SOD comparado com o grupo ND. Já

para o grupo DB-EAVR não houve diferença significativa; no entanto, houve diminuição da atividade da enzima para o grupo DB-GB.

Sobre a quantificação de grupamentos sulfidrilas totais, não houve diferença significativa para os grupos estudados. Entretanto, o grupo DB apresentou aumento na peroxidação lipídica pelo método de TBARS, e o grupo DB-EAVR reduziu significativamente a peroxidação lipídica. Já na análise da capacidade antioxidante total pelo método de FRAP, não houve diferença para os grupos diabéticos, mas houve aumento significativo para os grupos ND-EAVR e ND-GB.

Os resultados da análise das enzimas CAT, GPx e SOD das frações mitocondriais estão apresentadas na **Tabela 4**. Houve redução da atividade da enzima CAT no grupo DB, contudo os tratamentos com GB e EAVR dos grupos diabéticos apresentaram aumento dessa enzima. Bem como os grupos ND-EAVR e ND-GB apresentaram aumento significativo em relação ao grupo ND. Por outro lado, o grupo DB apresentou aumento da atividade da enzima GPx, enquanto os dois grupos DB-EAVR e DB-GB diminuíram significativamente. O grupo DB reduziu a atividade da SOD, assim como o grupo ND-EAVR, enquanto o grupo DB-EAVR aumentou a atividade dessa enzima.

Tabela 3. Avaliação dos parâmetros do estresse oxidativo no homogeneizado total de fígado de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.

	CAT Atividade/ $\mu\text{g}/\text{seg}$	GPx $\text{mmol}/\text{min}/\text{mL}$	GSH mM	GST $\mu\text{mol}.\text{min}^{-1}.\text{g}^{-1}$	SOD U/mg proteína	Sulfidrilas Totais $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína	FRAP $\mu\text{mol}/\text{Trolox}/\text{L}$	TBARS nmol/mg de proteína
ND	$334,49 \pm 23,11$	$2,17 \pm 0,17$	$3,74 \pm 0,29$	$121,22 \pm 6,91$	$0,57 \pm 0,10$	$3583,97 \pm 277,70$	$1558,57 \pm 88,01$	$1,54 \pm 0,08$
ND-EAVR	$439,65 \pm 37,84^{*a}$	$4,30 \pm 0,52^{*a}$	$4,80 \pm 0,34^{*a}$	$111,21 \pm 4,56$	$2,79 \pm 0,75^{*a}$	$3053,45 \pm 85,06$	$2021,18 \pm 121,27^{*a}$	$1,45 \pm 0,07$
ND-GB	$388,96 \pm 28,72$	$2,39 \pm 0,23$	$2,66 \pm 0,33^{*a}$	$105,31 \pm 0,862$	$0,62 \pm 0,07$	$3239,53 \pm 180,05$	$1874,85 \pm 72,28^{*a}$	$1,52 \pm 0,19$
DB	$348,20 \pm 23,28$	$3,81 \pm 0,32^{*a}$	$2,70 \pm 0,29^{*a}$	$84,80 \pm 5,09^{*b}$	$1,36 \pm 0,20^{*a}$	$3730,92 \pm 408,73$	$1590,58 \pm 100,23$	$1,90 \pm 0,12^{*a}$
DB-EAVR	$312,13 \pm 22,65$	$2,35 \pm 0,27^{\#a}$	$3,73 \pm 0,20^{\#a}$	$121,71 \pm 15,72^{\#a}$	$1,18 \pm 0,12$	$3721,61 \pm 423,52$	$1942,04 \pm 262,47$	$1,34 \pm 0,09^{\#a}$
DB-GB	$320,89 \pm 20,04$	$2,43 \pm 0,17^{\#a}$	$3,19 \pm 0,24$	$93,66 \pm 7,42$	$0,57 \pm 0,08^{\#b}$	$2974,08 \pm 159,50$	$1713,97 \pm 136,38$	$1,67 \pm 0,19$

Os dados são representados como média \pm S.E.M.; $n = 6$; $^a p < 0,05$, $^b p < 0,005$. *quando comparado com controle não diabético. #grupo diabético tratado quando comparado com o controle diabético. ND – animais não diabéticos. DB – animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. EAVR animais tratados com extrato aquoso de *Vochysia rufa*. GB animais tratados com glibenclamida.

Tabela 4. Avaliação da atividade das enzimas CAT, GPx e SOD na fração mitocondrial de fígado de ratos diabéticos e não diabéticos após 43 dias de tratamento com extrato aquoso de *Vochysia rufa*.

	CAT	GPx	SOD
	Atividade/ $\mu\text{g}/\text{seg}$	$\text{mmol}/\text{min}/\text{mL}$	U/mg proteína
ND	484,160 \pm 41,212	2,460 \pm 0,335	1,700 \pm 0,176
ND-EAVR	759,322 \pm 88,736 ^{*a}	5,606 \pm 0,465 ^{*c}	1,864 \pm 0,326
ND-GB	689,317 \pm 80,683 ^{*a}	3,601 \pm 0,536	1,143 \pm 0,0878 ^{*a}
DB	352,992 \pm 14,112 [*]	5,080 \pm 0,316 ^{*b}	0,858 \pm 0,153 ^{*a}
DB-EAVR	465,441 \pm 24,099 [#]	3,987 \pm 0,317 ^{#a}	1,218 \pm 0,0834 ^{#b}
DB-GB	486,330 \pm 31,092 [#]	1,578 \pm 0,0772 ^{#c}	0,895 \pm 0,0911

Os dados são representados como média \pm S.E.M.; n = 6; ^ap < 0,05, ^bp < 0,005, ^cp < 0,001 *quando comparado com controle não diabético. #grupo diabético tratado quando comparado com o controle diabético. ND – animais não diabéticos. DB – animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. EAVR animais tratados com extrato aquoso de *Vochysia rufa*. GB animais tratados com glibenclamida.

4.3 Análise Histopatológica

Os cortes histológicos corados em HE (**Figura 4**) revelaram fragmentos de fígado exibindo preservação do espaço porta com vasos sanguíneos (artérias e veias) e pequenos ductos biliares evidentes. Os capilares sinusóides mostraram-se preservados. As células de Kupffer foram observadas com aspectos usuais sem sinais evidentes de sua proliferação. Não foram observadas áreas com processo inflamatório, necrose, fibrose, proliferação, destruição e regeneração do parênquima. Sendo assim, não foram evidenciados aspectos histopatológicos que sugerem hepatotoxicidade.

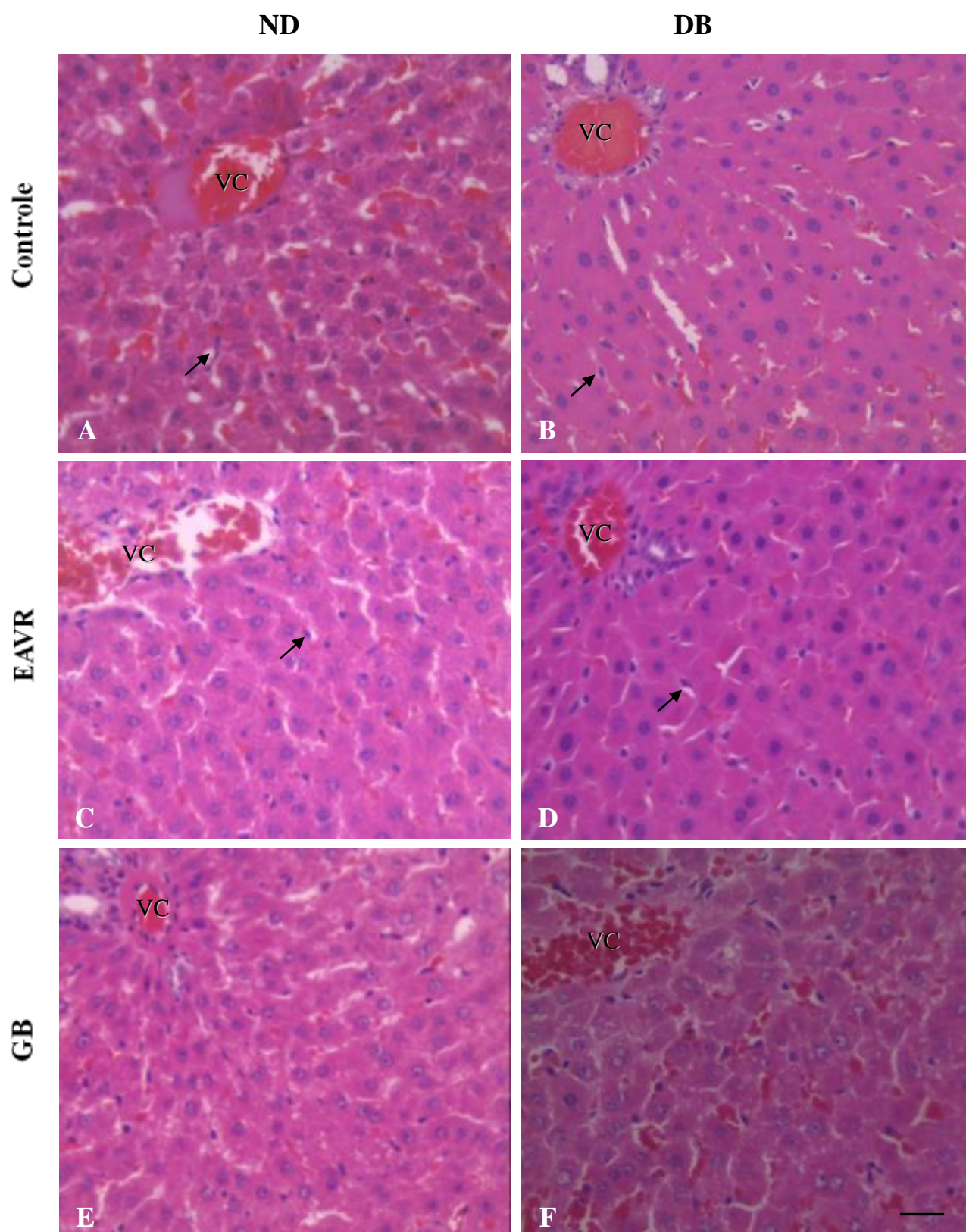


Figura 4. Fotomicrografias de cortes de fígado de ratos do grupo controle não diabético - ND (A), controle diabético - DB (B), não diabético tratado com extrato de *Vochysia rufa* (EAVR) (C), diabético tratado EAVR (D), não diabético tratado com glibenclamida GB (E), diabético tratado com GB (F). HE. (Barra = 25 μ m). VC – veia central, as células de Kupffer com aspecto usual estão indicadas pela seta.

4.4 Avaliação de apoptose

A frequência de núcleos apoptóticos, mostrada nos gráficos da **Figura 5**, pode ser identificada no pico de leitura observada próximo de zero (eixo x) do gráfico. O grupo ND sugere maior ocorrência de núcleos apoptóticos, enquanto que o grupo DB apresentou baixa frequência. No entanto, o tratamento dos indivíduos do grupo não diabético com glibenclamida sugere aumento na frequência de núcleos apoptóticos, por outro lado, não foi evidenciado aumento de núcleos apoptóticos para o mesmo tratamento no grupo diabético. Os grupos DB-EAVR e ND-EAVR evidenciam baixa frequência de núcleos apoptóticos.

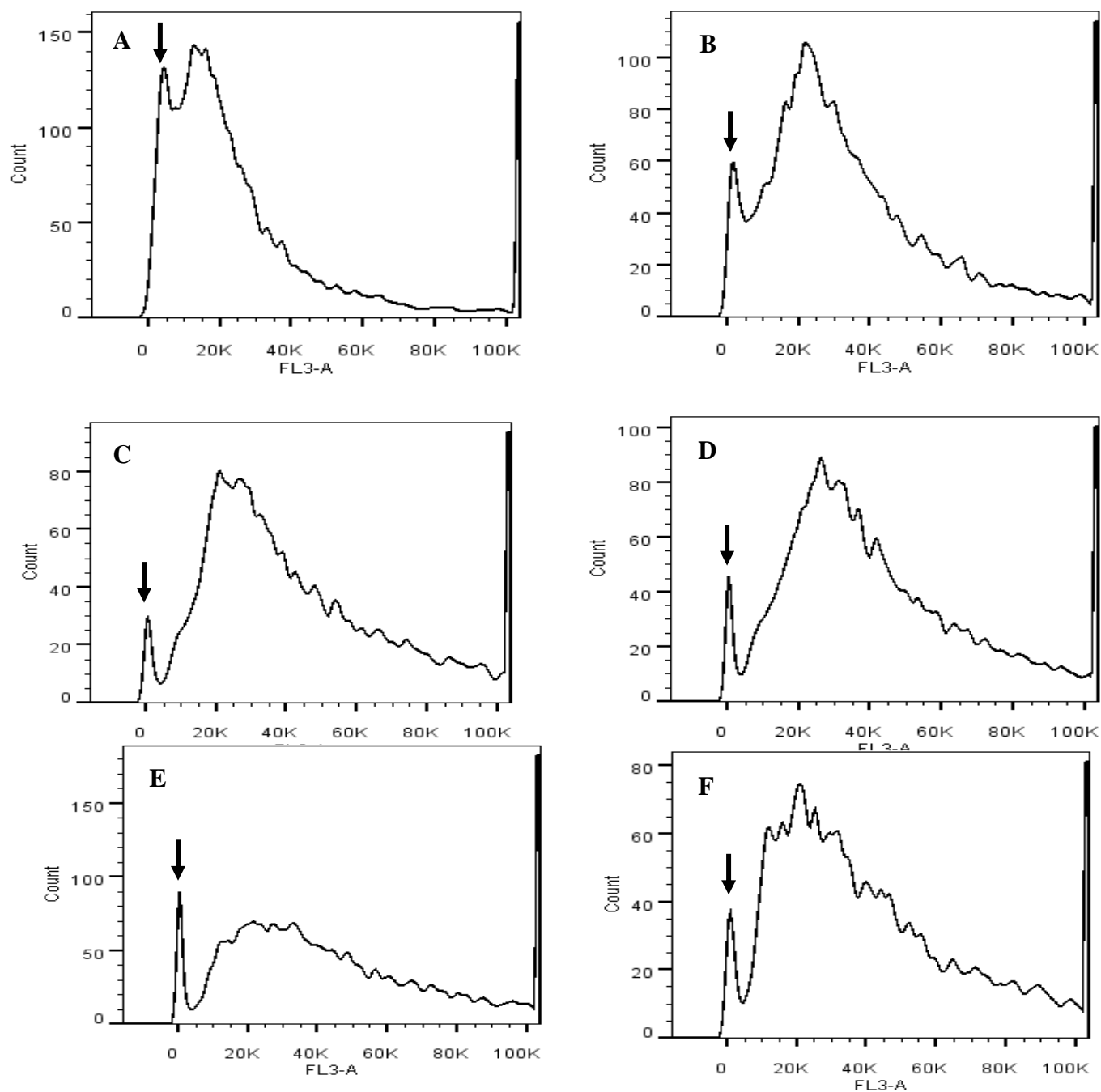


Figura 5. Citometria de fluxo de núcleos apoptóticos de hepatócitos de ratos do grupo controle não diabético (A); controle diabético induzido por estreptozotocina (STZ) (B); não diabético tratado com EAVR (C); diabético tratado com EAVR (D); não diabético tratado com GB (E) e diabético tratado com GB (F). Observa-se o pico de apoptóticos indicado pela seta.

5. Discussão

O modelo experimental animal diabético induzido por STZ é um modelo bem consolidado na literatura para o estudo do diabetes. Este modelo leva a hiperglicemia ocasionada pela redução da produção de insulina decorrente da destruição das células beta-pancreáticas. A hiperglicemia acarreta uma série de alterações metabólicas no fígado evidenciadas, sobretudo, pela avaliação das enzimas e compostos do sistema de defesa antioxidante (Reis, Veloso *et al.*, 2008; Matsunami, Sato *et al.*, 2010; Pazdro & Burgess, 2010). Esse desbalanço foi constatado no presente estudo pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes associadas ao dano oxidativo hepático no controle diabético.

O uso de plantas medicinais para o tratamento do DM aponta possíveis formas de amenizar os efeitos decorrentes dessa doença, principalmente por apresentarem redução da hiperglicemia e melhora no estresse oxidativo (Nakhaee, Bokaeian *et al.*, 2009; Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012; Rodrigues, Di Naso *et al.*, 2012).

Apesar do uso popular da *Vochysia rufa*, não há relatos na literatura sobre a eficiência dessa planta no tratamento do DM. Porém, pelos resultados obtidos no presente estudo, observa-se melhora considerável no quadro do estresse oxidativo hepático. No entanto, uma tese de doutorado (Gouveia, 2012) demonstrou que o extrato da planta apresenta melhoras no estresse oxidativo pancreático também. Outro trabalho que avaliou o índice de pêlos mutantes em asas de *Drosophila melanogaster* (por meio do teste SMART) demonstrou que o extrato não apresenta eventos mutagênicos significativos (Moraes, 2010).

Há dados na literatura que demonstram que a atividade das enzimas antioxidantes, principalmente CAT, SOD e GPx está diminuída em decorrência do diabetes (Rajasekaran, Sivagnanam & Subramanian, 2005; Abolfathi, Mohajeri *et al.*,

2012) e outros demonstram que há aumento na atividade de SOD e GPx (Yilmaz, Uz *et al.*, 2004; Matsunami, Sato *et al.*, 2010), o que sugere que ainda não existe um padrão de resposta fisiológico, uma vez que o mesmo depende das condições em que o experimento foi realizado, além de estar relacionado com a especificidade do tecido. Contudo, como evidenciado anteriormente, a diferença estatística foi significativa para os animais diabéticos em relação ao controle, o que sugere o desbalanço no estado redox, ou seja, no modelo experimental utilizado o estado diabético interferiu na atividade das enzimas.

Diversos trabalhos demonstram que o aumento da peroxidação lipídica está relacionado com o aumento do estresse oxidativo, principalmente no modelo animal diabético induzido por STZ (Sarkhail, Rahmanipour *et al.*, 2007; Prabakaran & Ashokkumar, 2012; Rodrigues, Di Naso *et al.*, 2012). Durante a hiperglicemia, a glicose é auto-oxidada e produz ânion superóxido, além de produzir radicais livres que, por sua vez, conduz à peroxidação lipídica em lipoproteínas e lipídeo de membrana (Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012).

O aumento na atividade da SOD no homogeneizado total do fígado de ratos diabéticos está de acordo com dados da literatura (Matsunami, Sato *et al.*, 2010; Rodrigues, Di Naso *et al.*, 2012) e esse aumento é o resultado de uma resposta adaptativa para o aumento do estresse oxidativo no tecido hepático. Por outro lado, a expressão da SOD mitocondrial apresentou o padrão inverso em relação ao homogeneizado total, ou seja, para o grupo diabético controle houve uma acentuada diminuição da atividade dessa enzima. Kapor & Kakkar (2012) demonstraram que em cultura de hepatócitos a expressão de MnSOD e de CuSOD obedecem padrões diferentes quando em meio hiperglicêmico. Nesse caso, a MnSOD está menos expressa, enquanto a CuSOD está mais expressa. Em células sob estresse, ocorre um aumento na

expressão de CuSOD, possivelmente como um mecanismo de defesa para superar o estresse oxidativo persistente.

O aumento da atividade de GPx tanto no homogeneizado total quanto na fração mitocondrial do grupo controle diabético foi demonstrado por outros pesquisadores (Yilmaz, Uz *et al.*, 2004; Díaz-Flores, Angeles-Mejia *et al.*, 2012), bem como a diminuição de GSH (Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012; Prabakaran & Ashokkumar, 2012). O sistema da glutathione é o principal mecanismo intracelular antioxidante, o qual depende da concentração de GSH, e da razão GSH/GSSG que são regulados pela síntese “de novo” da glutathione (ciclo redox) mediado pelas reações das enzimas GPx e GR. Contudo, a diminuição de GSH tem sido considerada como um marcador do estresse oxidativo (Díaz-Flores, Angeles-Mejia *et al.*, 2012). Além disso, o aumento da atividade de GPx em indivíduos diabéticos está relacionado com o alto índice de estresse oxidativo hepático nesses animais. Evidenciou-se uma diminuição da atividade da GST para o controle diabético, esse dado condiz com os resultados de outros pesquisadores (Prabakaran & Ashokkumar, 2012). A GST é uma família de isoenzimas que participa da conjugação de eletrófilos tóxicos com a GSH, portanto, a diminuição da atividade dessa enzima observada nos ratos diabéticos deve estar relacionada com a redução da disponibilidade de GSH.

Não foi observada diferença na atividade da CAT no homogeneizado total do fígado para o controle e tratamentos diabéticos. Rodrigues, Di Naso e colaboradores (2012) também não encontraram diferença significativa para essa enzima. No entanto, como demonstrado por Celik, Sahin e colaboradores (2012) não houve diferença para o homogeneizado total, mas observou-se diminuição da atividade da enzima na fração mitocondrial no grupo diabético, o que também foi evidenciado no presente estudo. A CAT está localizada nos peroxissomos e catalisa a decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 ;

portanto, protege a célula contra os danos induzidos pelo peróxido de hidrogênio. A diminuição da atividade dessa enzima no grupo controle diabético, indica a ocorrência do estresse oxidativo nesse grupo.

O tratamento dos animais diabéticos com o EAVR apresentou melhora significativa para diversos parâmetros analisados, o que foi evidenciado pela diminuição da peroxidação lipídica, bem como a redução da atividade da GPx, a níveis próximos aos do controle não diabético, tanto no homogeneizado total quanto na fração mitocondrial. Além disso, houve aumento significativo na atividade da GST, que protege as células dos efeitos tóxicos de compostos nocivos e previne o desenvolvimento do dano oxidativo (Amer, Gahttas *et al.*, 2011). O aumento na atividade de MnSOD e de CAT na fração mitocondrial está em conformidade com os valores encontrados no grupo controle não diabético, assim como o aumento dos níveis de GSH. Outros trabalhos sobre o uso de plantas para o tratamento do diabetes apresentaram melhora no estresse oxidativo (Sarkhail, Rahmanipour *et al.*, 2007; Dornas, Oliveira, *et al.*, 2009; Guerra, Magalhães *et al.*, 2011; Abolfathi, Mohajeri *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados para o grupo diabético tratado com GB, evidenciando a restauração nos níveis de GPx tanto do homogeneizado total quanto da fração mitocondrial, bem como a atividade da CAT para a fração mitocondrial e a dosagem de SOD no homogeneizado total. Concordando com os dados apresentados por Sarkhail, Abdollahi e colaboradores (2010).

Por outro lado, o tratamento do grupo não diabético com o EAVR apresentou resultados que sugerem aumento da defesa antioxidante, estando os parâmetros aumentados quanto as enzimas CAT e GPx no homogeneizado total, quanto GSH e SOD para a fração mitocondrial.

A respeito da análise histopatológica, não houve indícios de alterações que sugerem hepatotoxicidade. Um estudo comparativo entre vários períodos de tratamento com o diabetes feito por Inoue, Ohtake e colaboradores (2005) demonstrou que os danos hepáticos decorrentes do diabetes acontecem após um período crônico, cerca de 12 semanas. No entanto, o tratamento realizado no presente estudo foi de 6 semanas. Sendo assim, é possível que as alterações no grupo diabético não tenham sido visualizadas pela microscopia de luz por esse motivo. Além disso, um trabalho que avaliou o efeito mutagênico do extrato de *Vochysia rufa* em pelos da asa de *Drosophila melanogaster* demonstrou menor frequência de mortes em indivíduos da linhagem que apresenta alta taxa de metabolismo, chamada de HB (*High Bioactivation*), devido aos elevados níveis enzimáticos do complexo CYP450 (Moraes, 2010). Esse composto é abundante no fígado e atua na metabolização dos compostos xenobióticos (Takiguchi *et al.*, 2010), o que poderia estar relacionado à ausência de evidência de toxicidade hepática, uma vez que, possivelmente, eventuais compostos tóxicos presentes no extrato da planta, poderiam ter sido metabolizados por esse complexo enzimático, reduzindo seu efeito tóxico.

O baixo índice de apoptose observado no controle diabético está de acordo com dados encontrados na literatura (Herman, Sanders *et al.*, 1999) que evidenciou a diminuição da frequência de células apoptóticas no fígado de animais diabéticos induzidos por STZ relacionada com a ocorrência de hepatomegalia nesses animais, uma vez que foi constatado também, um aumento no peso relativo do fígado para esse grupo, indicando um aumento do tamanho do fígado em relação ao peso corporal. Esse aumento no peso relativo do fígado também foi evidenciado no presente estudo. O aumento no crescimento tecidual pode ser resultado da alteração do número de células (hiperplasia), crescimento celular (hipertrofia) e/ou morte celular (apoptose), de modo

que todos esses mecanismos estão relacionados com o diabetes (Herman, Sanders *et al.*, 1999). O tratamento com o EAVR tanto dos indivíduos não diabéticos quanto diabéticos sugere que o extrato da planta apresenta efeito anti-apoptótico, pois apresenta baixa frequência de núcleos apoptóticos em ambos os grupos. Latha, Pari e colaboradores (2004) demonstraram o efeito anti-apoptótico de uma planta utilizada para o tratamento do diabetes (*Scoparia dulcis*) no tecido pancreático. Outros autores também demonstraram efeito anti-apoptótico de plantas (Abdelwahab, Mohan *et al.*, 2011; El-Beshbishy, Tork *et al.*, 2010).

No entanto, houve maior frequência de apoptose nos animais não diabéticos tratados com GB. Hambrock, Franz e colaboradores (2006) demonstraram que a glibenclamida induz o processo de apoptose em células HEK293 que estão acentuadamente marcadas pela expressão de SUR1, que é uma proteína pancreática típica, e por essa razão provavelmente está envolvida no processo de apoptose das células β - pancreáticas. Outros artigos explicam que a indução de apoptose pela glibenclamida está relacionada com o aumento de influxo de Ca^{2+} nas células (Kim, Kang *et al.*, 1999; Iwakura, Fujimoto *et al.*, 2000).

6. Conclusão

Os resultados apresentados demonstram que o estresse oxidativo está acentuado nos animais diabéticos induzidos por STZ, há diminuição na frequência de apoptose nesse grupo, bem como aumento do peso relativo do fígado, sugerindo que essas alterações são decorrentes da pato-fisiologia do diabetes no tecido hepático. O EAVR melhora os efeitos deletérios do estresse oxidativo ocasionados pelo diabetes, uma vez que, nas condições testadas, o nível das enzimas e compostos relacionados ao sistema de defesa antioxidante tendem a seguir os padrões encontrados no controle não-diabético. Além disso, foi evidenciado que o EAVR tem efeito anti-apoptótico, o que confere ainda mais proteção contra os danos induzidos na célula pelo estresse oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os compostos farmacologicamente ativos no extrato aquoso de *Vochysia rufa*, bem como a definição das doses que apresentam melhores resultados na redução da glicemia e efeitos da planta em outros órgãos.

7. Referência Bibliográfica

Abdelwahab, S. I., S. Mohan, *et al.* Antiapoptotic and Antioxidant Properties of *Orthosiphon stamineus* Benth (Cat's Whiskers): Intervention in the Bcl-2-Mediated Apoptotic Pathway. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2011, p.1-11. 2011.

Abdul-Ghani, M. A. e R. A. Defronzo. Mitochondrial Dysfunction in Type 2 Diabetes - An Update. US Endocrinology, v.4, n.2, p.28-31. 2008.

Abolfathi, A. A., D. Mohajeri, *et al.* Protective Effects of Green Tea Extract against Hepatic Tissue Injury in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2012, p.1-10. 2012.

Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymology, v.105, p.121-126. 1984.

Ali, H., P. J. Houghton, *et al.* A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. Journal of Ethnopharmacology, v.107, p.449-455. 2006.

Amer, M .A., D.M. Ghattas., *et al.* Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on type-2 diabetes mellitus risk. Genetics and Molecular Research, v.10, n.4, p.3722-3730. 2011.

Baynes, J. W. & S. R., Thorpe. Perspectives in Diabetes Role of Oxidative Stress in Diabetic Complications - A New Perspective on an Old Paradigm. Carbonyl Stress and Diabetic, v.48, p.1-10. 1999.

Bechmann, L. P., R. A. Hannivoort, *et al.* The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. Journal of Hepatology, v.56, p.952-964. 2012.

Benzie, I. F. F & J.J. Strains. Ferric reducing/antioxidant Power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Methods in Enzymology, v.299, p. 15-27, 1999.

Beutler, E., O. Duron, B. M. Kelly, Improved method for the determination of blood glutathione. The journal of Laboratory and Clinical Medicine. V. 61, p. 882-90, 1963.

Blobel, G. & V. R. Potter. Nuclei from Rat Liver: Isolation Method That Combines Purity with High Yield. Science, v.154, p.1662-1665. 1966.

Bouderba, S., M. N. Sanz, *et al.* Hepatic Mitochondrial Alterations and Increased Oxidative Stress in Nutritional Diabetes-Prone *Psammomys obesus* Model. Experimental Diabetes Research, v.2012, p.1-8. 2012.

Boveris. In: Methods Enzymology. Vol 105, Packer L Editor, pp 429-435. Academic Press, New York, 1984.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.

Celik, V. K., Z. D. Sahin, *et al.* Comparison of Oxidant/Antioxidant, Detoxification Systems in Various Tissue Homogenates and Mitochondria of Rats with Diabetes Induced by Streptozocin. Experimental Diabetes Research, v.2012, p.1-5. 2012.

Celikler, S., S. Tas, *et al.* Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* thanolic extract in the experimental diabetes mellitus. Food and Chemical Toxicology, v.47, p.1837-1840. 2009.

Costa, A.A. & J.S.N. Almeida. Manual de Diabetes. 4ª Ed. São Paulo: Sarvier, 2004.

Cvervinková, Z., H. Lotková, *et al.* Evaluation of Mitochondrial Function in Isolated Rat Hepatocytes and Mitochondria during Oxidative Stress. Alternatives to Laboratory Animals - ATLA, v.35, p.353-361. 2007.

DataSUS.Hiperdia. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/hiperdia/gibenclamida.php>. Acesso em: 15 ago. 2011.

De PaυLa, A. C. C. F. F., R. V. Sousa, *et al.* Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.38, n.6, p.885-893. 2005.

Dey, A. e K. Swaminathan. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. Life Sciences, v.87, p.197-214. 2010.

Díaz-Flores, M., S. Angeles-Mejia, *et al.* Effect of an aqueous extract of *Cucurbita ficifolia* Bouché on the glutathione redox cycle in mice with STZ-induced diabetes. Journal of Ethnopharmacology, v.144, p.101-108. 2012.

Dornas, W. C., T. T. Oliveira, *et al.* Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, p.488-500. 2009.

El-Beshbishy, H. A., O. M. Tork, *et al.* Antioxidant and antiapoptotic effects of green tea polyphenols against azathioprine-induced liver injury in rats. Pathophysiology, v.18, p.125-135. 2010.

Ferreira, A. L. A. & L. S. Matsubara. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev Ass Med Brasil, v.43, n.1, p.61-68. 1997.

Ferreira, E. A., E. F. Gris, *et al.* Potent hepato protective effect in CCl₄-induced hepatic injury in mice of phloroacetophenone from *Myrcia multiflora*. Lybian Journal of Medicine, v.5, p.4891-4900. 2010.

Flohe, L.; W.A Gunzler,. Assays of glutathione peroxidase. Methods in Enzymology, v. 105, p. 114-121, 1984.

Fukai, T. e M. Ushio-Fukai. Superoxide Dismutase: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. Antioxidants & Redox Signaling, v.15, n.6, p.1583-1606. 2011

Genet, S., R. K. Kale, *et al.* Alterations in antioxidant enzymes and oxidative damage in experimental diabetic rat tissues: effect of vanadate and fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*). Molecular and Cellular. Biochemistry, v.236, p.7-12. 2002.

Giacco, F. e M. Brownlee. Oxidative Stress and Diabetic Complications. Journal of the American Heart Association, v.107, p.1058-1070. 2010.

Gomes, R. C., F. Bonamin, *et al.* Antioxidative action of methanolic extract and buthanolic fraction of *Vochysia tucanorum* Mart. In the gastro protection. Journal of Ethnopharmacology, v.121. p.466-471. 2009.

Gouveia, N. M. D. **Avaliação do controle glicêmico sanguíneo e do estresse oxidativo em pâncreas de animais diabéticos induzidos e não diabéticos tratados com extrato de *Vochysia rufa* e faseolamina.** [Tese – Doutorado]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia - Instituto de Genética e Bioquímica, 2012.

Guerra, J. F. D. C., C. L. D. B. Magalhães, *et al.* Dietary açai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. Journal Clinical Biochemistry Nutrition, v.49, n.3, p.188-194. 2011.

Gupta, S., S. B. Sharmaa, *et al.* Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes. Journal of Ethnopharmacology, p.1-5. 2009.

Habig, W. H., M. J. Pabst; W. B. Jakoby. Glutathione s-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. The Journal of Biological Chemistry, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974

Halliwell, B., J. M. C. Gutteridge, 2003. Free radical in Biology and Medicine. 3° ed. New York: Oxford Science Publications.

Hambrock, A., C. B. D. O. Franz, *et al.* Glibenclamide-Induced Apoptosis Is Specifically Enhanced by Expression of the Sulfonylurea Receptor Isoform SUR1 but Not by Expression of SUR2B or the Mutant SUR1(M1289T). The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v.316, n.3, p.1031-1037. 2006.

Hamden, K., S. Carreau, *et al.* Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: Protective effect of 17 β -estradiol. Steroids, v.73, p.495–501. 2008.

Hamza, N., B. Berke, *et al.* Prevention of type 2 diabetes induced by high fat diet in the C57BL/6J mouse by two medicinal plants used in traditional treatment of diabetes in the east of Algeria. Journal of Ethnopharmacology, v.128, p.513–518. 2010.

Herman, C. E., R. A. Sanders, *et al.* Decreased Apoptosis as a Mechanism for Hepatomegaly in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. Toxicological Sciences, v.50, p.146-151, 1999.

Hermes-Lima, M.; W. G. Willmore, & K. B. Storey. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III) xylenol orange complex formation. Free Radical Biology & Medicine, vol 19, n. 3, p. 271-280, 1995

Hsu, Y. J., T. H. Lee, *et al.* Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. Journal of Ethnopharmacology, v.122, p.379–383. 2009.

Huber, P. C., W. P. Almeida, *et al.* Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. Química Nova, v.31, n.5, p.S1-S4. 2008.

Inoue, M., T. Ohtake, *et al.* Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.336, p.215-222. 2005.

Islam, M. D. Effects of the aqueous extract of white tea (*Camellia sinensis*) in a streptozotocin-induced diabetes model of rats. Phytomedicine. v.19, p.25-31. 2011

Iwakura, T. Fujimoto, S., *et al.* Sustained enhancement of Ca(2+) influx by glibenclamide induces apoptosis in RINm5F cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 271, p.422-428. 2000.

Jackson, M. J., S. Papa, *et al.* Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. Molecular Aspects of Medicine, v.23, n.1-3, p.209-285. 2002.

Jennings, P. E., A. F. Jones, *et al.* Increased diene conjugates in diabetic subjects with micro angiopathy. Diabetes Medicine, v.4, n.5, p.452-6. 1987.

Kahn, S. E., R. L. Hull, *et al.* Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. Nature, v.444, n.14, p.840-846. 2006.

Kapoor, R. & P. Kakkar. Protective Role of Morin, a Flavonoid, against High Glucose Induced Oxidative Stress Mediated Apoptosis in Primary Rat Hepatocytes. Plos One, v.7, n.8, p.1-11. 2012.

Kim, J. A., Kang, Y. S., *et al.* Glibenclamide induces apoptosis through inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl(-) channels and intracellular Ca(2+) release in HepG2 human hepatoblastoma cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 261, p.682-688. 1999.

Latha, M., L. Pari, *et al.* *Scoparia dulcis*, a Traditional Antidiabetic Plant, Protects Against Streptozotocin Induced Oxidative Stress and Apoptosis In Vitro and In Vivo. Journal Biochemistry and Molecular Toxicology, v.18, n.5, p.261-272. 2004.

Levy, J., R. A. Cobas, *et al.* Assessment of efficacy and tolerability of once-daily extended release metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetology & Metabolic Syndrome, v.18, p.2-16. 2010.

Maia, F. F. R. & L. R. Araújo. Aspectos psicológicos e controle glicêmico de um grupo de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 em Minas Gerais. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia, v.48, n.2, p.261-266. 2004.

Mantena, S. K., A. L. King, *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. Free Radical Biology & Medicine v.44, p.1259-1272. 2008.

Marí, M., A. Morales, *et al.* Mitochondrial glutathione: Features, regulation and role in disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) [In press]. 2012.

Matsunami, T., Y. Sato, *et al.* Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. Int J Clin Exp Pathol, v.3, n.2, p.177-188. 2010.

Moraes, I. B. **Avaliação da atividade mutagênica do extrato aquoso de *Vochysia rufa* Mart. (Vochysiaceae) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*.** [Monografia – Graduação]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia – Curso de Ciências Biológicas. 2010.

Nakhnaee, A., M. Bokaeian, *et al.* Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, v.24, n.4, p.419-425. 2009.

Negri, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.41, n.2, p.121-142. 2005.

O AVANÇO do diabetes no mundo, segundo a OMS. [2012]. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2132-o-avanco-do-diabetes-no-mundo-segundo-a-oms>>. Acesso em 23 jan. 2013.

Olalyea, M. T. & J. B. T. Rocha. Commonly used tropical medicinal plants exhibit distinct *in vitro* antioxidant activities against hepatotoxins in rat liver. Experimental and Toxicologic Pathology, v.58, p.433–438. 2007.

Oliveira, H. C., M. P. Dos Santos, *et al.* Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. Journal of Ethnopharmacology, v.115, p.515–519. 2008.

Paes, T., F. M. Gazoni, *et al.* Necrose Isquêmica Hepática e Diabetes Melito. Relato de Caso. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, v.19, n.4, p.490-493. 2007.

Park, C. H., J. S. Noh, *et al.* Evaluation of Effects of Chinese Prescription Kangerkaryu on Diabetes-Induced Alterations such as Oxidative Stress and Apoptosis in the Liver of Type 2 Diabetic *db/db* Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2012, p.1-12. 2012.

Pazdro, R. e J. R. Burgess. The role of vitamin E and oxidative stress in diabetes complications. Mechanisms of Ageing and Development, v.131, p.276-286. 2010.

Poornima, I. G., P. Parikh, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. Circulation Research, v.98, p.596-605. 2006.

Prabakaran, D. e N. Ashokkumar. Protective effect of esculetin on hyperglycemia-mediated oxidative damage in the hepatic and renal tissues of experimental diabetic rats. [In press]. Biochimie, p.1-8. 2012.

Rajasekaran, S., K. Sivagnanam, *et al.* Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. Pharmacological Reports, v.57, p.90-96. 2005.

Reis, J. S., C. A. Veloso, *et al.* Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. Arq Bras Endocrinol Metab, v.52, n.7, p.1096-1105. 2008.

Rodrigues, G. R., F. C. Di Naso, *et al.* Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. Journal of Biomedicine and Biotechnology, v.2012, p.1-7. 2012.

Rodrigues, G., E. Marcolin, *et al.* Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (Sacaca) in diabetic rats. Arq Gastroenterol, v.47, n.3, p.301-305. 2010.

Rolo, A. P. e C. M. Palmeira. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Review*. Toxicology and Applied Pharmacology, v.212, p.167-178. 2006.

Rosen, P., P. P. Nawroth, *et al.* The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, v.17, n.3, p.189- 212. 2001.

Rossetti, L., A. Giaccari, *et al.* Mechanism by Which Hyperglycemia Inhibits Hepatic Glucose Production in Conscious Rats. Journal Clinical Investigations, v.92, p.1126-1134. 1993.

Sarkhail, P., M. Abdollahi, *et al.* Effect of *Phlomis persica* on glucose levels and hepatic enzymatic antioxidants in streptozotocin-induced diabetic rats. Pharmacognosy Magazine, v.6, n.23, p.219-224. 2010.

Sarkhail, P., S. Rahmanipour, *et al.* Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: Effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. Pharmacological Research, v.56, p.261-266. 2007.

Schultes, R. E & R. F. Raffauf. The Healing Forest. Medicinal and Toxic Plants of the Northwest Amazonia. Dioscorides Press: Portland, Oregon. 1990. 484p.

Shao, D., S.-I. Oka, *et al.* Redox modification of cell signaling in the cardiovascular system. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, v.52, n.3, p.550-558. 2012.

Siddiqui M. R., A. Taha, *et al.* Amelioration of altered antioxidant status and membrane linked functions by vanadium and Trigonella in alloxan diabetic rat brains. Journal of Biosciences, v.30, p.483-490. 2005.

Silva, M. A. B. **Levantamento etnobotânico e triagem hipolipidêmica de Plantas Medicinais do Cerrado Mato-grossense: Avaliação da Atividade hipolipidêmica da *Simaba ferruginea* St. Hil. e *Vochysia rufa* Mart.** [Dissertação – Mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso – Faculdade de Ciências Médicas; 2009.

Takiguchi, M., W. S. Darwish. *et al.* Metabolic activation of heterocyclic amines and expression of CYP1A1 in the tongue. Toxicological Science, v.116, p.79-81. 2010.

Torres, R., F. Faini, *et al.* Antioxidant activity of coumarins and flavonols from the resinous exudate of *Haplopappus multifolius*. Phytochemistry, v.67, p.984–987. 2006.

Vasconcelos, S. M. L., M. O. F. Goulart, *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. Química Nova, v.30, n.5, p.1323-1338. 2007.

Vianna, M. C. Vochysiaceae na Reserva Biológica de Poço das Antas, Silva Jardim, Rio de Janeiro, Brasil. Revista Rodriguésia, v. 57, n.3, p.659-666. 2006.

Vicentino, A. R. R. & F. D. S. Menezes. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.17, n.3, p.384-387. 2007.

Weniger, B., A. Lostein, *et al.* Bioactive Triterpenoids from *Vochysia pacifica* Interact with cyclic nucleotide Phosphodiesterase Isozyme PDE4. Phytotherapy Research, v.19, p.75-77. 2005.

WHO. **World Health Statistics**. Geneva. 2012. Disponível em <[http:// www.who.int](http://www.who.int)>. Acesso em 23 jan. 2013.

Yilmaz, H. R., E. Uz, *et al.* Protective Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Diabetic Rat Liver. Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology, v.18, n.4, p.234-238. 2004.

Zucaro Y. L., R. S. Compagnonea, *et al.* Hydromaslinic acid, a triterpene from *Vochysia ferruginea*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.11, p.241–244. 2000.

Anexo



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 060/10 DO COMITÊ DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 054/09

Projeto Pesquisa: “Avaliação de extratos vegetais sobre a inibição da alfa-amilase in vitro e controle da glicemia, atividade antioxidante e alterações histológicas em animais diabéticos induzidos e não diabéticos”.

Pesquisador Responsável: Foued Salmen Espíndola

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

.

Uberlândia, 07 de abril de 2010

Prof. Dr. Evandro de Abreu Fernandes
Coordenador do CEUA/UFU