



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIS FERNANDO DE PAULO

**PERFIL DA RECUPERAÇÃO DO PÂNCREAS E RINS DE
RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS COM FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DE *Trichilia catigua*: ANÁLISE
BIOQUÍMICA, MORFOLOGIA TECIDUAL E ESTADO REDOX**

Londrina
2017

LUIS FERNANDO DE PAULO

**PERFIL DA RECUPERAÇÃO DO PÂNCREAS E RINS DE
RATOS WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS COM FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DE *Trichilia catigua*: ANÁLISE
BIOQUÍMICA, MORFOLOGIA TECIDUAL E ESTADO REDOX**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini Armani.

Co-Orientadora: Prof. Dra. Jacqueline Nelisis
Zanoni

Londrina
2017

LUIS FERNANDO DE PAULO

**PERFIL DA RECUPERAÇÃO DO PÂNCREAS E RINS DE RATOS
WISTAR DIABÉTICOS TRATADOS COM FRAÇÃO ACETATO DE
ETILA DE *Trichilia catigua*: ANÁLISE BIOQUÍMICA, MORFOLOGIA
TECIDUAL E ESTADO REDOX**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Coorientadora: Prof^a. Dra. Jacqueline Nelisis
Zanoni
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof^a. Dra. Eduardo José de Almeida Araújo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Jair Tonon
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dra. Juliana Vanessa Colombo Martins
Perles
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina,, 03 de Abril de 2017.

*Dedico esse trabalho a meu **PAI**, Wilson Luis de Paulo,
por seu amor incondicional, por me ensinar a ser o Homem que hoje sou,
e por seu exemplo perfeito de sempre.*

*Dedico esse trabalho a minha **MÃE**, Cleide Aparecida da Silva de Paulo,
Por ser essa mulher de fibra que sempre foi, e por me mostrar que tudo se torna
possível, quando buscamos nossos objetivos seguindo o caminho da retidão.*

*Dedico esse trabalho a meu **IRMÃO**, Luiz Gustavo de Paulo,
Por ser meu grande amigo, e por nossas brigas que sempre corrigidas por
nossos Pais, nos fizeram crescer como Homens que buscam o bem,
e realizam seus sonhos buscando objetivos sérios e corretos.*

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é o único tesouro dos humildes.”

William Shakespeare

A **Deus**, pela vida, e por tudo que nela me proporcionaste. Pelos desafios que pensava não conseguir vencer, entre eles esse Curso, e principalmente pela Fé que me fez e me faz forte sempre para superá-los.

A minha **Orientadora**, *Professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani*, pela convivência, pela correção quando necessária, pela compreensão, e pelo companheirismo.

A minha **Co-Orientadora**, *Professora Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni*, por ter aceitado o desafio de me co-orientar e por me encorajar a seguir em frente a cada pensamento de que tudo poderia ir por água abaixo. Por acreditar na minha capacidade e pelas instruções históricas de sempre, pela coragem de inovar sempre nas pesquisas que se propõe a desenvolver e principalmente por participar da minha **Defesa** como **Orientadora Oficial** com sua calma, capacidade intelectual e orientação sempre competente elucidando cada dúvida. Sua atenção e sua dedicação comigo, me mostraram que sempre temos **Pais** fora de nossa família que nos acolhem para ajudar-nos a vencer os desafios a que nos lançamos muitas vezes no escuro de nossa imaturidade.

A minha família: Minha **Mãe**, *Cleide Aparecida da Silva de Paulo*, você Mãe com certeza é a mulher mais linda e correta que conheço, e os momentos a seu lado me fazem mais completo e correto em minha vida. Meu **Pai**, *Wilson Luis de Paulo*, seus ensinamentos me fizeram mais Digno e mais Homem sempre, e sua presença sempre foi motivo de Orgulho pra mim. Meu **Irmão**, *Luiz Gustavo de Paulo*, ser seu irmão com certeza é a melhor parte de nossa família, tenho muito orgulho de você e torço sempre pelo seu sucesso, assim como sei que torce sempre pelo meu.

A minha **Namorada**, *Muriel Fernanda de Lima*, pela parceria, incentivo, compreensão nesta etapa de minha vida, e principalmente pelas discussões sempre muito proveitosas e produtivas pelo trabalho. Não poderia esquecer sua ajuda na análise estatística e também na interpretação dos resultados. Por sua presença, amor e afeto para comigo, em todas as fases da nossa caminhada. Você meu amor me faz crescer sempre mais e mais, no amor que sinto e principalmente por me fazer uma pessoa melhor a cada momento.

A minha **Cunhada**, *Patrícia Mancini de Paulo* e meu **Sobrinho**, *Davi Mancini de Paulo*, vocês são muito especiais para nós. Conviver com vocês é sempre muito bom.

Aos meus **Avós**: *Sebastião e Maria, Ignês e Nelson*, e aos Tios: *Fátima e Orlando*, vocês são espelhos em minha vida e tenho muito orgulho de desfrutar do amor de vocês.

Aos meus **Familiares**, *Tios, Primos, Sobrinhos e Afilhados*. Nossa família é completa por termos Deus em nossas vidas. Agradeço o apoio incondicional de sempre e peço desculpas pelas ausências que esse curso me forçou fazer.

Aos **Professores** do **Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina – UEL** e do **Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá – UEM**: *Professor Dr. Eduardo José de Almeida Araújo, Professora Dra. Flávia Alessandra Guarnier, Professor Dr. Jair Tonon, Professora Dra. Juliana Vanessa Colombo Martins Perles, Professora Dra. Poliana Camila Marinello, Professor Dr. Rodrigo Cabral Luiz e Professor Dr. Rubens Cecchini* pela participação nas Bancas de Qualificação e na de Defesa do Doutorado e por todas as correções e sugestões feitas ao trabalho.

Aos **Demais Professores** do **Programa de Pós- Graduação em Patologia Experimental – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL**, pela dedicação nas aulas e na pesquisa. Em especial ao **Coordenador** *Professor Dr. Rubens Cecchini*, exemplo de seriedade e clareza no tratar da ciência. Vocês sempre são espelhos para nós que achamos somos

pesquisadores e que aos poucos entendemos que muito ainda temos a entender e descobrir.

Ao **Secretário** do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina - UEL, ***Sérgio Camargo Sisti***, pela orientação nos assuntos administrativos e pelo socorro nos prazos sempre.

Aos **Professores** do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá - UEM, pelas discussões e pelos ensinamentos durante essa etapa. E principalmente as ***Professora Dra. Luzmarina Hernández e Professora Dra. Maria Raquel Marçal Natali***, pelo auxílio na interpretação dos resultados muitas vezes obscuros, mas que se tornaram claros após as discussões.

Ao **Professor Rodrigo Mello Gomes**, do Departamento de Ciências Fisiológicas – UEM, e agora do Departamento de Ciências Fisiológicas – UFG, pela sociedade científica, e pelo companheirismo durante o desenvolvimento do trabalho. Nossas execuções de técnicas, discussões e interpretações de resultados nos fizeram crescer e enriquecer esses trabalhos.

Ao **Grande Mestre, Marcello Fabiano de Franco**, do Departamento de Patologia da Escola Paulista de Medicina – EPM (UNIFESP), obrigado por sua dedicação, sua atenção e principalmente pela prontidão em me atender. Nossa convivência foi curta, mas talvez a mais gratificante e estimulante desse Curso. Sua coragem, determinação, dedicação ao trabalho são espelhos para os novos pesquisadores. Obrigado de coração, essa conquista é sua também Professor Marcello, principalmente pelo auxílio durante a Análise Histológica de todas as lâminas do projeto foi essencial. Estar sentado ao lado de um dos Grandes Mestres da Patologia Mundial é uma Honra de poucos, e eu posso dizer sem modéstia, eu tive essa Honra. E afirmo sem medo de errar, o Senhor é totalmente fora de sério.

A todos os **Colegas** do curso de ***Pós-Graduação***, pelo convívio, auxílio e companheirismo no compartilhar científico e pessoal.

A **Minha Segunda Mãe, Eurides**, você é Demais, em tudo, e sabe do meu amor desde bebezinho por você. Você é um exemplo pra mim na Histologia, e quero ser no futuro um pouquinho do que você foi.

As **Técnicas** do **Laboratório de Histologia da UEM**: *Maria Dos Anjos e Mariângela*, vocês são especiais, e fazem parte da minha vida. Obrigado pela ajuda de sempre e por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos meus **Amigos** dos **Laboratórios da UEM**, minha família científica: *Bruna Colombo, Francielle Ramalho, Camila Quaglio, Bruna, Juliana Perles, Sara Gusman, Flávia Frez, Priscila Bonato, Camila, Leonora, Heber Amilcar, Geraldo, Evandro, Paulo Botura, Jean Besson, Ana Paula Santi Rampazzo*, os mais chegados e os mais distantes, obrigada pela companhia, pelas discussões e esclarecimentos durante todo o curso.

Aos meus **Amigos** dos **Laboratórios da UEL**, minha outra família científica: *Flávia Guarnier, Fernando Henrique, Thâmara, Thamara. Mônica Sbeghen, Mônica Belém, Tácito Campos, Rafaela Macagnan, Fernando, Eduardo Vignoto, Fernanda Ogo* e outros mais que menos convivemos.

Um agradecimento especial a **amiga** e agora *Professora Dra. Poliana Marinello*, pelo auxílio na execução das técnicas do Estresse Oxidativo, e principalmente na discussão dos resultados e esclarecimentos sobre o tema.

Aos **Colegas** da **Diretoria de Análises Clínicas e Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário Regional de Maringá**, pela parceria durante os momentos de trabalho no **Laboratório de Análises Clínicas**: em especial os que tive maior convivência, nas nossas longas noites: *Cleide, Mirian Jaqueline, Valdeci, Vera, Talma, Vânia, Julia Estuani, Lucia, Paulo, Solange, Luis Henrique, Miriam, Cecília, Natalie, Iara, Rafael, Bruno, Vilma, Sandra, Val, Silvia, Silvana, Simone, Gilberto, Cris, Milton, Mayra, Rafael, Lucélia, Crispim, Luis Carlos, Silvio, Marinês, Mirian, Elisabeth*, de maneira muito respeitosa e especial, as Chefes do Início do Curso: *Angelita Polato e Daniela Dambroso* e também o atual **Marcos Antonio Américo**, e todos os Demais que convivemos durante os anos de LAC, para onde agora retornarei.

Aos amigos da **Farmácia Hospitalar**: em especial aos chefes *Lenir Fátima Camargo e José Gilberto Pereira*, meu amigo e hoje Diretor de Análises Clínicas e Farmácia Hospitalar *Cleverson Antonio Poças*, e também: *Monique, Kelen, Gisella, Sóstenes, Anderson, Cleverson, Camila, Talita, Karla, Anna Luisa, Léo, Alzélia, Paulo, Buck, Júlio, Cléo, Oriza, Santana, Jance, Amanda, Joel, Ariene, Dani, Helena, Sandra, Guedes* e todos os demais. Fazer parte da família HU – UEM sempre será uma Honra.

Aos **Colegas** do *Pronto Socorro do Hospital Universitário Regional de Maringá*, pela parceria durante os momentos de dificuldade. Pela garra com que enfrentam diariamente os desafios que a Saúde Pública nos impõe e pelo companheismo que sempre reina nas relações.

As **Amigas** *Jorseli Coimbra, Jordana Coimbra, Mayara Coimbra e Marta Leli*, pelos papos e pelos conselhos. As discussões e a companhia sempre foram essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

Um agradecimento especial a duas pessoas que merecem todo o carinho do mundo, minha mais que **Amigas** de Pronto Socorro, *Maria dos Anjos de Souza Lino e Lindinalva Louzada*. Conviver com vocês com certeza foi e é a melhor experiência que nos leva a entender que tudo tem seu tempo e depende sempre do tempo de Nosso Deus.

As **Amigos da Citologia**, *Josefa Florêncio Rodrigues, Neide Becegatto, Taila Vaz, e Edmar Parente*, por me ensinarem Citopatologia, Macroscopia e Técnica Histológica e por fazerem de mim uma pessoa mais séria, responsável e atenta as oportunidades da vida.

Aos meus eternos Mestres da Patologia, *Prof. Dr. Washington Rodrigues Camargo e Profa. Dra. Renata Bianco Consolaro*, que me ensinaram a Amar a Patologia e me mostraram logo nos primeiros meses do meu primeiro emprego, na Nossa Saudosa e Sempre Presente UNINGÁ – dirigida pela pessoa do Competente Diretor Geral *Dr. Ricardo Benedito de Oliveira*, que me deu a chance de iniciar

minha carreira na área Laboratorial – e demonstraram que *Ser Professor de Patologia*, é saber lidar diariamente com a “*Arte e Ciência no Ensinar e Aprender*”.

Ao **Grupo São Camilo – Divisão de Anatomia Patológica e Citopatologia**, em especial ao *Dr. Leo Sergio Rugeri, Dr. Sérgio Piva, Dr. Ricardo Oikawa, Dra. Juliana Magalhães, Dra. Gisele Itália Ruggeri Chiuchetta e Dra. Keila Pinzan*, para onde agora retorno após alguns anos, pensando poder contribuir com meu trabalho para o sucesso da empresa. Agradeço imensamente a confiança em mim depositada. Sei da importância das análises laboratoriais para o sucesso da medicina, e quero poder contribuir com meu trabalho para o Sucesso dessa empresa que é referência na área de Medicina Diagnóstica. Sem esquecer dos amigos que a Patologia me apresentou: *Jéssica, Rosa, Pedro, Fernanda Lopes, Dafny, Luciane, Josyane, Renata, Adriana, Fernanda Cândido, Mateus, Taila, Dayana, Daniela, Michele, Maysa, Débora, Lívia, Rosângela, Márcia, Gislaine, Tereza, Jéssica, Meire, Rafael, Murilo, Rose* e todos os demais que trabalham conosco.

Ao **Laboratório Maringá – Anatomia Patológica e Citopatologia**, em especial ao *Dr. Alex Moisés Pimenta e Dra. Priscila Valério Lima*, pela oportunidade de trabalharmos juntos e por contribuírem para o meu desenvolvimento profissional. Um agradecimento especial aos amigos de sempre *Ricardo, Samuel e Júlio Ceasar*, e a todos os funcionários com quem trabalhei sempre.

Ao **Laboratório Souza – Anatomia Patológica e Citopatologia**, em especial ao *Dra. Paola Costa Souza e Dr. Robson José Silva Souza*, por fazer parte da minha vida como profissional da Anatomia Patológica e aos profissionais com que atuei.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas,
Mesmo expondo-se ao fracasso, do que
alinhar-se com os pobres de espírito,
Que nem gozam muito, nem sofrem muito,
Porque vivem numa penumbra cinzenta,
Onde não conhecem nem vitória, nem derrota.*

(...)

*Se fracassar, ao menos que fracasse ousando grandes feitos,
De modo que a sua postura não seja nunca
a dessas almas frias e tímidas
Que não conhecem nem a vitória nem a derrota.”*

Theodore Roosevelt

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios:



LABORATÓRIO DE PATOLOGIA MOLECULAR

Universidade Estadual de Londrina – UEL
Centro de Ciências Biológicas – CCB
Departamento de Ciências Patológicas - DCP

Professora Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani



LABORATÓRIO DE FISIOPATOLOGIA DOS RADICAIS LIVRES

Universidade Estadual de Londrina – UEL
Centro de Ciências Biológicas – CCB
Departamento de Ciências Patológicas - DCP

Professor Dr. Rubens Cecchini



LABORATÓRIO DE PLASTICIDADE NEURAL ENTÉRICA

Espaço Segundo Cérebro

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Centro de Ciências Biológicas – CCB
Departamento de Ciências Morfológicas - DCM

Professora Dra. Jacqueline Nelisis Zanoni



LABORATÓRIO DE HISTOLOGIA ANIMAL

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Centro de Ciências Biológicas – CCB
Departamento de Ciências Morfológicas - DCM

Professora Dra. Luzmarina Hernandes



LABORATÓRIO PALAFITO

Universidade Estadual de Maringá – UEM
Centro de Ciências da Saúde - CCS
Departamento de Farmácia - DFA

Professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello



LABORATÓRIO DE PATOLOGIA RENAL

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP
Escola Paulista de Medicina - EPM
Departamento de Patologia - DP

Professor Dr. Marcello Fabiano de Franco



LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Hospital Universitário Regional de Maringá – HURM
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dra. Angelita Polato / Dra. Daniela Dambroso / Dr. Marcos A. Américo



GRUPO SÃO CAMILO – Medicina Diagnóstica

Anatomia Patológica e Citopatologia

Dr. Léo Sérgio Ruggeri / Dr. Sérgio Piva

Dr. Ricardo Oikawa / Dra. Juliana Magalhães / Dra. Gisele Itália



LABORATÓRIO MARINGÁ

Anatomia Patológica e Citopatologia

Dr. Alex Moisés Pimenta / Dra. Priscila Valério Lima



SOUZA PATOLOGIA

Anatomia Patológica e Citopatologia

Dra. Paola Costa Souza / Dr. Robson Souza

PAULO, Luis Fernando de. **Perfil da recuperação do pâncreas e rins de ratos wistar diabéticos tratados com fração acetato de etila de *trichilia catigua*: análise bioquímica, morfologia tecidual e estado redox.** 2017. 129 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica de distribuição mundial, e caracteriza-se pela deficiência ou não produção de insulina pelas células β pancreáticas. Essa deficiência apresenta como principal resultado a hiperglicemia crônica, que por sua vez produz alterações metabólicas e sistêmicas. O diabetes apresenta 4 tipos básicos: o DM Tipo 1, DM Tipo 2, Diabetes Gestacional e outros tipos de DM. Dentre as principais complicações do DM temos alterações bruscas nos níveis da glicose (hiperglicemia e hipoglicemia) e o desenvolvimento de doenças secundárias ao estado diabético, como a retinopatia, complicações cardiovasculares, neuropatia e nefropatia. A nefropatia diabética caracteriza-se por alterações histopatológicas no tecido renal, que levam a lesão dos glomérulos e túbulos distais muitas vezes por mecanismos de estresse oxidativo, e juntamente com lesões pancreáticas criam um ambiente favorável para o desenvolvimento das complicações do DM. A utilização de compostos naturais no tratamento de doenças crônicas tem sido bastante estudado. A Catuaba (*Trichilia catigua*) é popularmente utilizada no tratamento de estresse, impotência, déficit de memória e fadigas, e estudos recentes mostram resultados promissores apresentando efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a Fração de Acetato de Etila de *Trichilia catigua* (EAF) possui algum efeito atenuador ou farmacológico sobre as complicações decorrentes do DM. Para isso, utilizou-se Ratos Wistar divididos em 4 grupos: N - normoglicêmico, N-EAF – normoglicêmico tratado com EAF (200 mg / kg); D: diabéticos e D-EAF: diabético tratado com EAF (200 mg / kg). O diabetes foi induzido por uma única injeção de estreptozotocina (STZ) (35 mg / kg) na veia peniana. Dois dias após a injeção de STZ, o EAF foi administrado por gavagem, 7 dias por semana, durante 8 semanas. Durante o período do experimento os animais foram analisados quanto a parâmetros metabólicos: peso, ingestão de água e ingestão de ração. Após esse período foram coletados o sangue total dos animais para análises bioquímicas (glicemia, função renal, função hepática e função pancreática) e análises hematológicas. O pâncreas e os rins foram coletados para análises morfométricas e histopatológicas. Os ratos do grupo D apresentaram redução de peso corporal, tecido adiposo e massa muscular ($p < 0,05$). Estes animais apresentaram aumento na ingestão de alimentos e água e hiperglicemia com atrofia das ilhotas pancreáticas ($p < 0,05$). No entanto, a administração EAF no grupo D-EAF atenuou a perda de massa corporal e redução da ingestão de alimentos e de água ($p < 0,05$). Além disso, o tratamento EAF em ratos D-EAF promoveu um efeito hipoglicemiante com redução de 24% da glicose no sangue ($P < 0,05$) e melhora a outros parâmetros bioquímicos. A análise da imunohistoquímica para marcação da insulina mostra aumento do número de células β e ilhotas tamanho significativo no grupo D-EAF por proliferação de células- β marcado com PCNA. Além disso, os nossos estudos histopatológicos mostraram que EAF promove redução nos danos do tecido renal (glomeruloesclerose, degeneração

glicogênica e depósito de colágeno) em ratos com diabetes tratados com EAF. as análises do estresse oxidativo apresentaram a capacidade da *T. catigua* proteger os rins da peroxidação lipídica. O presente estudo mostrou que extrato de *T. catigua* melhora a homeostase da glicose, protege o pâncreas das ações da STZ sobre as células β , e protege os rins da peroxidação lídica inibindo o desenvolvimento da nefropatia diabética em ratos induzidos por STZ.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Nefropatia diabética. *Trichilia catiguá*. Lesão renal. Lesão pancreática. Proteção.

PAULO, Luis Fernando de. **Profile of recovery of the pancreas and kidneys of wistar diabetic rats treated with fraction ethyl acetate of trichilia catigua: biochemical analysis, tissue morphology and redox state.** 2017. 129 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease of worldwide distribution, and is characterized by deficiency or non-production of insulin by pancreatic β cells. This deficiency presents as main result the chronic hyperglycemia, which in turn produces metabolic and systemic alterations. Diabetes presents 4 basic types: Type 1 DM, Type 2 DM, Gestational Diabetes and other types of DM. Among the main complications of DM we have sudden changes in glucose levels (hyperglycemia and hypoglycemia) and the development of diseases secondary to the diabetic state, such as retinopathy, cardiovascular complications, neuropathy and nephropathy. Diabetic nephropathy is characterized by histopathological alterations in renal tissue, which lead to injury of the glomeruli and distal tubules, often due to mechanisms of oxidative stress, and together with pancreatic lesions, create a favorable environment for the development of DM complications. The use of natural compounds in the treatment of chronic diseases has been well studied. Catuaba (*Trichilia catigua*) is popularly used in the treatment of stress, impotence, memory deficit and fatigue, and recent studies show promising results with antioxidant and anti-inflammatory effects. Thus, the objective of this study was to evaluate whether the *Trichilia catigua* Ethyl Acetate Fraction (EAF) has some attenuating or pharmacological effect on the complications resulting from DM. For this, Wistar rats were divided into 4 groups: N-normoglycemic, N-EAF-normoglycemic treated with EAF (200 mg / kg); D: diabetics and D-EAF: diabetic treated with EAF (200 mg / kg). Diabetes was induced by a single injection of streptozotocin (STZ) (35 mg / kg) into the penile vein. Two days after STZ injection, EAF was given by gavage, 7 days a week, for 8 weeks. During the period of the experiment the animals were analyzed for metabolic parameters: weight, water intake and feed intake. After that period, the animals' whole blood was collected for biochemical analysis (blood glucose, renal function, liver function and pancreatic function) and hematological analysis. The pancreas and kidneys were collected for morphometric and histopathological analyzes. The rats of group D showed reduction of body weight, adipose tissue and muscle mass ($p < 0.05$). These animals had an increase in food and water intake and hyperglycemia with atrophy of the pancreatic islets ($p < 0.05$). However, EAF administration in the D-EAF group attenuated body mass loss and reduced food and water intake ($p < 0.05$). In addition, EAF treatment in D-EAF rats promoted an hypoglycemic effect with a 24% reduction in blood glucose ($P < 0.05$) and improvement in other biochemical parameters. The immunohistochemical analysis for labeling of insulin shows an increase in the number of β cells and islets of significant size in the D-EAF group by PCNA-labeled proliferation of β -cells. In addition, our histopathological studies have shown that EAF promotes reduction in renal tissue damage (glomerulosclerosis, glycogen degeneration and collagen deposition) in rats with diabetes treated with EAF. The oxidative stress analyzes showed the ability of *T. catigua* to protect the kidneys from lipid peroxidation. The present study showed that *T. catigua* extract improves glucose

homeostasis, protects the pancreas from STZ actions on β cells, and protects the kidneys from lipid peroxidation by inhibiting the development of diabetic nephropathy in STZ-induced rats.

Keywords: Diabetes mellitus. Diabetic nephropathy. *Trichilia catigua*. Renal injury. Pancreatic injury. Protection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES	24
3. COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS	27
3.1. Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)	27
3.1.1. Hiperglicemia	30
3.1.2. Hipoglicemia	31
3.3.3. Doenças Cardiovasculares	33
3.3.4. Retinopatia Diabética	34
3.3.5. Neuropatia Diabética	35
3.3.6. Nefropatia Diabética	36
3.3.7. Lesões Pancreáticas	37
4. MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS EM ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO 1	38
4.1. Diabetes Mellitus induzido quimicamente	38
4.2. Diabetes Mellitus espontâneo	39
5. CATUABA	41
5.1. Efeitos Biológicos da Catuaba	43
6. HIPÓTESES	46
7. OBJETIVOS	47
7.1. Objetivo Geral	47
7.2. Objetivos Específicos	47
8. ARTIGOS	48
9. CONCLUSÕES	49

10. REFERÊNCIAS	51
11. ANEXOS	58
ARTIGO 1	59
Anti-Diabetic Effects of the Ethyl-Acetate Fraction of <i>Trichilia catigua</i> in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats	60
ARTIGO 2	86
Fração acetato de etila de <i>Trichilia catigua</i> protege animais das complicações decorrentes da nefropatia diabética	87
APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	129

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica diagnosticada, no ano de 2015, em aproximadamente 450 milhões de pessoas pelo mundo. Trata-se de uma doença silenciosa, o que contribui para um diagnóstico tardio (BRASIL, 2013).

O DM é caracterizado por uma hiperglicemia causada por uma desordem que leva a falha do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Falha esta ocasionada pelo déficit na produção de insulina pelo pâncreas, ou mesmo pela ineficiência da ação desse hormônio nos tecidos (MARITIM; SANDERS, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; ARYA; YADAV; SHARMA, 2011).

O DM tem seus primeiros registros encontrados em papiros egípcios com idade aproximada de 3500 anos, e durante todo esse tempo buscou-se explicações sobre as características da doença, suas causas e tratamentos (BARNETT; KRALL, 2009).

Nas décadas de 1980 e 1990 a Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceram os primeiros critérios de diagnóstico e tratamento.

Em 1997 foram estabelecidos quatro critérios básicos de diagnóstico clínico do DM: 1) presença de sintomas como polidipsia, poliúria e perda de peso, acompanhadas de dosagem de glicose sanguínea acima de 200 mg/dl; 2) glicemia de jejum acima de 126 mg/dl, com repetição em mais de um dia para confirmação; 3) glicemia de jejum acima de 200 mg/dL duas horas após ingestão de 75 g de glicose; 4) dosagem de hemoglobina glicada acima de 6,5% (BARNETT; KRALL, 2009; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

Classicamente o DM é dividido em quatro grupos reconhecidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) de 2012 e 2014, pela *International Diabetes Federation* (IDF) de 2013 e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) de 2014, distinguindo características clínicas e fisiológicas bem definidas:

1) *Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)*: caracteriza-se pela destruição das células β pancreáticas, ocasionando a deficiência na produção de insulina. É uma doença que afeta principalmente crianças e representa cerca de 5% a 10% dos casos de DM. A destruição é variável e pode levar deficiência total causada principalmente por uma reação de autoimunidade contra as células β pancreáticas (apoptose das células β). Existe ainda outro tipo de DM1 como forma idiopática e sem marcadores de auto-imunidade.

2) *Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)*: é caracterizada pela insuficiência progressiva das células β pancreáticas, diminuição da produção e resistência periférica à insulina de maneira tardia. Representa cerca de 90% dos casos de DM, com incidência em indivíduos a partir dos 40 anos de idade ou mais. Para o DM2 existem ***estágios pré-diabéticos***, onde não se tem sintomas clínicos, mas sim a glicemia de jejum alterada (entre 100 a 126 mg/dL) e tolerância a glicose diminuída (glicemia entre 140 a 200 mg/dL, após ingestão de 75g glicose). Esta síndrome de resistência está também ligada a fatores de risco cardiovascular como obesidade e sedentarismo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011, 2012, 2014).

3) *Diabetes Mellitus Gestacional (DMG)*: quadro hiperglicêmico identificado durante a gestação, com complicações para a gestante e o feto. O desenvolvimento da DMG constitui-se cofator de risco ao desenvolvimento da DM2. Sua fisiopatologia é explicada pela elevação de hormônios contra-reguladores da

insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais). O principal hormônio relacionado com a resistência à insulina durante a gravidez é o hormônio lactogênico placentário, contudo, sabe-se hoje que outros hormônios hiperglicemiantes como cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina também estão envolvidos.

4) Outros tipos de Diabetes (DMO): ligados a problemas de ordem genética, levam ao funcionamento ineficiente das células β pancreáticas, defeitos na secreção e ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino ou medicamentoso por efeito adverso.

Dentre as complicações da DM destaca-se a nefropatia diabética, caracterizada por distúrbios microvasculares facilitada pela predisposição genética e pela hiperglicemia, comprometendo a função dos glomérulos renais (espessamento das membranas basal e tubular) e conseqüentemente a esclerose mesangial. Com a instalação da esclerose mesangial, a concentração da glicose no citoplasma torna-se aumentada, culminando em insuficiência renal (BARNETT; KRALL, 2009; ARYA; YADAV; SHARMA, 2011; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011, 2012, 2014).

Com o excesso de glicose e dos produtos da glicação avançada, a síntese proteica da matriz extracelular (laminina, tenascina e colágeno) é estimulada. Esse fenômeno ocasiona a esclerose glomerular, principalmente devido ao depósito de colágeno I e III, pelo aumento de eventos inflamatórios e pelo estresse oxidativo local (EKOE et al, 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Histologicamente a nefropatia diabética apresenta a hipertrofia glomerular, espessamento da base do glomérulo, expansão da matriz mesangial e glomeruloesclerose. A expansão progressiva da matriz mesangial é resultado do

aumento da degradação protéica extracelular mesangial rica em fibronectina e colágeno, que após extenso aumento desse quadro leva a lesão de capilares e conseqüentemente a insuficiência renal (ONKAMO et al., 1999; EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A hiperglicemia crônica contribui de maneira significativa para que sejam formadas as espécies reativas de oxigênio (EROS), os quais desequilibram o balanço oxidativo. Como resultado tem-se a instalação do quadro de injúria tecidual, criando um ambiente de estresse oxidativo que altera a função molécula, ativa respostas celulares, como a transcrição do fator NF-KB, e ativação da proteína cinase C (HANAS, 2007; BOSI et al., 2009; OBSERVATÓRIO NACIONAL DA DIABETES, 2013).

O DM é um das doenças que aparece no *roll* de pesquisas científicas mundiais com destaque na utilização de produtos naturais em seu tratamento.

Compostos como taninos e flavonoides possuem capacidade de prevenir doenças degenerativas causadas pelo desequilíbrio fisiopatológico do diabetes¹³⁻¹⁷. A maior parte das plantas utilizadas para o tratamento do diabetes apresentam capacidade hipoglicemiante, reduzindo os danos causados pela disfunção das células pancreáticas produtoras de insulina (HANAS, 2007; STENE et al., 2010; RAIMUNDO, 2010).

Nesta perspectiva, a *Trichilia catigua* A. Juss, no Brasil também conhecida como Catuaba, Catuama e Catiguá, distribuída por toda América Latina, tem apresentado capacidade de redução da fadiga e do estresse, bem como a promoção de efeitos benéficos frente a distúrbios neurológicos, inflamatórios e do estresse oxidativo (ATKINSON; MACLAREN, 1994; RAIMUNDO, 2010; SANTOS et al.; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; THABIT; HOVORKA; EVANS, 2012).

No presente trabalho, buscamos entender a capacidade hipoglicemiante da Catuaba, bem como o efeito frente as complicações metabólicas, bioquímicas, pancreáticas e da histologia renal do diabetes tipo I.

2. EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES

O diabetes é considerado um problema de saúde pública e é agravado pela falta de conhecimento sobre a doença e suas complicações e a ausência de sintomas iniciais ou de um diagnóstico preciso, dificultando a associação dos sintomas à doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A distribuição do DM no mundo apresenta prevalências muito discrepantes, sendo que tem-se por exemplo grande acometimento da população em regiões da Oceania e no Arizona (EUA), no qual a metade da população é diabética. No Brasil cerca de 15% da população é diabética, no entanto, ressalta-se sempre que casos não diagnosticados ainda ficam à margem dessas estatísticas (ONKAMO, 1999).

Existe uma distribuição diferente entre os tipos de DM e sua epidemiologia, sendo que o DM tipo 1 apresenta distribuição não uniforme entre as diferentes populações, acometendo em menor número pessoas negras e asiáticas em contraponto a populações caucasianas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012, 2014).

Essa distribuição não uniforme apresenta-se em números muito expressivos quando comparado à incidência desta doença no Japão, onde se encontra 1 a 2 casos a cada 100.000 habitantes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012). Já na Finlândia há o alarmante achado de 40 casos em 100.000 indivíduos. Atrelado a essa informação, os casos de DM1 tem aumentado significativamente em países como a Suécia, Noruega e Polônia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A diferença de incidência apresentada tem como pano de fundo as bases ambiental e genética com predisposição acentuada no continente Europeu. Nos Estados Unidos a incidência é de 0,5% da população acometidas pelo DM1 e no Brasil 8 casos a cada 100.000 pessoas (ONKAMO, 1999; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Dentre os casos de DM, 90% são DM2. Esses casos estão ligados ao estilo de vida da população que tem mudado drasticamente nos últimos anos. Por ser definido como DM ligado a resistência à insulina, está diretamente ligada à obesidade que tem aumentado em números alarmantes na população em geral. Estudos epidemiológicos apresentam uma progressão nos casos de DM2, sendo que na década de 1980 cerca de 7% da população era diabética e hoje pode-se detectar que os dados chegam ao acometimento de cerca de 20% da população mundial (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012, 2014).

Os demais tipos de DM, DMG e DMO, correspondem a cerca de 0,5% dos casos de diabetes e por estarem restritos a etiologias específicas para o desenvolvimento da doença (EKOE et al., 2008; BOSI, 2009; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014). No Brasil, o SUS (Sistema Único de Saúde) apresenta uma política de prevenção e tratamento do DM, no entanto, ainda aparece nos primeiros lugares entre os países com maior número de indivíduos acometidos, com cerca de 15 milhões de pessoas (SANTOS, 2012).

Nos últimos anos os gastos com saúde no Brasil têm aumentado drasticamente nos serviços públicos e privados, sendo que no ano de 2013, os gastos com o diagnóstico e tratamento do DM chegaram a 550 milhões de dólares, o

que corresponde a 10 % dos gastos com saúde do adulto. Esses casos de DM foram responsáveis pela morte de cerca de 6 milhões de pessoas economicamente ativas em todo mundo, correspondendo a uma morte a cada 6 segundos ((INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

3. COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS

Por ser uma doença de complicações graves, muitas vezes tem-se o diagnóstico tardio com comprometimento dos diversos órgãos e sistemas, tornando o tratamento ainda mais oneroso para o sistema de saúde e piorando o prognóstico. Contribui para isso, ainda, a relação da doença com as populações de baixa renda, que apresentam menor instrução para o tratamento e menor acesso aos serviços de saúde (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Sabendo da existência de dois tipos principais de DM, Tipo 1 e 2, com complicações semelhantes, o presente trabalho atenta-se para o DM1, devido a facilidade de acesso ao modelo laboratorial de indução do DM e pela melhor instalação do quadro de hiperglicemia necessário para o desenvolvimento das complicações.

3.1. Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)

Os casos de DM1, acontecem principalmente a partir da infância, especialmente em crianças (90% dos casos). Sendo que as causas do aumento destes números não estão esclarecidas, há hipóteses relacionadas com os fatores genéticos, alimentação na infância, riscos ambientais e possíveis infecções virais (HANAS, 2007; STENE et al. 2010; RAIMUNDO, 2010; SANTOS, et al. 2011; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; THABIT; HOVORKA; EVANS, 2012; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; OBSERVATORIO NACIONAL DA DIABETES, 2013).

No DM1 as células β pancreáticas deixam de produzir insulina. Na maior parte dos casos esta falha de produção está relacionada com a morte das células β pancreáticas, morte esta que induzida por reações autoimunes (ATKINSON; MACLAREN, 1994; OBSERVATORIO NACIONAL DA DIABETES, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A forma mais comum do DM1 tem como causa a apresentação de antígenos de células β pancreáticas pelos linfócitos, criando um processo de insulite, caracterizada pela infiltração de células inflamatórias mononucleadas nas ilhotas do pâncreas, o que resulta na destruição das células β pancreáticas, que impede ou prejudica o reparo tecidual e conseqüente diminuição ou mesmo interrupção da produção de insulina (ATKINSON; MACLAREN, 1994; HANAS, 2007; PATTON, 2011; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2013).

Além disso, tem-se a produção de anticorpos contra as células β pancreáticas que leva a uma resposta humoral concomitantemente. Deve-se, no entanto, ressaltar que o processo de resposta imunológica frente às células β pancreáticas ocorre sempre de maneira abrupta (BONNER-WEIR, 2000; IMAGAWA; HANAFUSA; MIYAGAWA; MATSUAWA, 2000; GROSS et al., 2002; DANEMAN, 2006; HU, 2011; INZUCCHI et al., 2012). Pacientes acometidos pelo DM1, devem receber a terapêutica com administração de insulina será realizada durante toda vida (STENE et al., 2010; SANTOS, et al., 2011; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; THABIT; HOVORKA; EVANS, 2012).

A insulina é um hormônio que tem como função primordial mediar a entrada de glicose dentro das células para sua utilização como função energética. O mesmo hormônio apresenta também função no metabolismo das proteínas e lipídeos. No DM1, a baixa produção ou ausência de insulina pelas células β

pancreáticas, resulta em altos níveis de glicose plasmática e dificuldade na utilização pelas células do organismo. Estes dois fenômenos estão associados a inúmeros sintomas e complicações do diabetes. Os sintomas iniciais incluem a poliúria, glicosúria, polidipsia, polifagia, emagrecimento e cansaço crônico (HANAS, 2007; HU, 2011; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2013; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Esse quadro de falta de insulina leva a não utilização da glicose pelas células e mudança do metabolismo em busca de fontes de energia (reservas de gorduras), aumentando a utilização dos lipídios. No entanto esta mudança metabólica resulta na formação de corpos cetônicos que em poucas horas serão responsáveis por caracterizar um quadro de cetoacidose crônico (HANAS, 2007; HU, 2011; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2013; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

O tratamento do DM1 tem como foco principal a manutenção da glicemia dentro dos limites da normalidade - de até 110 mg/dL em jejum, com picos de 140 mg/dL em casos de pós refeição. Esse controle visa prevenir complicações micro e macrovasculares do diabetes a longo prazo, como por exemplo as retinopatias, neuropatias e nefropatias e o controle se dá pela aplicação exógena de insulina (INTERNACIONAL SOCIETY FOR PEDIATRIC AND ADOLESCENT DIABETES, 2009; DUARTE; GOIS, 20012; BOAVIDA; GARDETE-CORREIA, 2005; ABREU, 2010; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012).

Ressalta-se, no entanto, que o uso contínuo da insulinoterapia faz com que o controle glicêmico se torne muito difícil, com riscos eminentes de hipoglicemia (THABIT; HOVORKA; EVANS, 2012).

Os métodos de acompanhamento da glicemia mais comumente utilizados são a dosagem da glicemia de jejum e dosagem da hemoglobina glicada fração A1c, ou mais popularmente conhecida como Hemoglobina Glicada A1c (HbA1c) (DUARTE; GOIS, 2002; BOAVIDA; GARDETE-CORREIA, 2005; ABREU, 2010; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012).

Para a ADA os níveis toleráveis de HbA1c são de até 6,5% para pessoas acima de 19 anos e 7,0% para menores. Estudos de acompanhamento de grandes grupos de pacientes diabéticos constataram que o controle glicêmico regular e severo, tem contribuído de maneira muito significativa para a diminuição de complicações mais graves do diabetes. Estima-se que a diminuição da HbA1c em 1%, contribui para a diminuição das complicações em até 30% (DCCT RESEARCH GROUP, 1987, 1993; NATHAN, 2014).

3.1.1. Hiperglicemia

O quadro de hiperglicemia clinicamente está instalado quando temos valores de glicemia acima de 200mg/dL de sangue. As hiperglicemias acontecem principalmente pelo não acompanhamento dos pacientes em seus tratamentos com insulina, falta de exercícios físicos, com abusos alimentares, distúrbios alimentares e situações estressantes (HANAS, 2007; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Um processo que pode ocorrer de forma concomitante com a hiperglicemia é a cetoacidose diabética, tendo como sintomas principais vômitos, náuseas e quando não tratada a tempo pode levar ao coma diabético. Esse quadro apresenta-se como o mais frequente em casos de atendimento de jovens e adultos jovens em serviços de emergência (CARVALHO; DELGADO, 2013).

3.1.2. Hipoglicemia

As hipoglicemias acontecem quando se tem níveis de glicose sanguínea abaixo de 70 mg/dL, sendo que as mesmas podem apresentar quadros de hipoglicemia leve, moderada ou severa, dependendo do tempo e da amplitude da falta de glicose (TABAEI et al., 2004; CRIER, 2010; SARAIVA, 2010; HOLT; KUMAR, 2010; LAWTON, et al., 2012; RINTALA; PAAVILAINEM; ASTED-KURKI, 2013; CARVALHO; DELGADO, 2013; REACH, 2014).

Essa falta de glicose no sangue pode ser causada por inúmeros mecanismos, como a pouca ingestão de alimentos, excesso de exercícios, ingestão de carboidratos que tem absorção lenta, doses de insulinas fora dos padrões e estresse (TABAEI et al., 2004; CRIER, 2010; SARAIVA, 2010; HOLT; KUMAR, 2010, 2010; LAWTON et al., 2012; RINTALA; PAAVILAINEM; ASTEDT-KURKI, 2013).

Os casos de hipoglicemia em geral apresentam sintomas clássicos como: sensação de fome, sudorese, dormências de extremidades, tremores e fraqueza, além de palpitações e ansiedade. Em casos de hipoglicemia grave tem-se sintomas cerebrais como confusão mental, visão turva e dores de cabeça (TABAEI et al., 2004; HANAS, 2007; CRIER, 2010; SARAIVA, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012).

Um dos órgãos que mais sofre com baixos níveis de glicose no sangue é o cérebro, que precisa uma grande quantidade de glicose para o desenvolvimento de suas atividades, sendo que níveis muito baixos de glicose levam a falhas no funcionamento desse importante órgão. Essa necessidade vital para o cérebro acontece pela sua incapacidade de produção de glicose por vias alternativas quando da falta da mesma na circulação (INTERNATIONAL SOCIETY FOR PEDIATRIC AND ADOLESCENT DIABETES, 2009; CRIER, 2010).

A terapêutica de primeira escolha sempre será a reposição de açúcar o mais rápido possível, de preferências com açúcar de rápida absorção, não se esquecendo de administrar concomitantemente açúcares de baixa absorção que serão indispensáveis para a manutenção dos níveis glicêmicos. Casos onde a hipoglicemia grave não é tratada a tempo, levam a complicações severas como o coma hiperglicêmico, que deve ser tratado de maneira mais abrupta por injeções de medicamentos que liberam as reservas de açúcar para a corrente sanguínea (HANAS, 2007; SARAIVA, 2010; HOLT; KUMAR, 2010; LAWTON et al., 2012; CORREIA; RAPOSO; BOAVIDA, 2012; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Pacientes que apresentam casos de hipoglicemia frequentes devem ser instruídos a comunicar e ensinar seus pares a como proceder de forma adequada em casos de crise hipoglicêmica. Somente com conhecimento sobre a doença é que o controle glicêmico dos pacientes se torna efetivo e as complicações tornam-se menos graves (HANAS, 2007; INTERNATIONAL SOCIETY FOR PEDIATRIC AND ADOLESCENT DIABETES, 2009; CRIER, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2012; LAWTON et al., 2012; INTERNATIONAL

DIABETES FEDERATION, 2013; RINTALA; PAAVILAINEM; ASTEDT-KURKI, 2013; REACH, 2014).

3.3.3. *Doenças Cardiovasculares*

O paciente diabético apresenta a capacidade de desenvolver doenças cardiovasculares devido ao comprometimento do metabolismo dos lipídeos tornando-se alvo de preocupação dos pesquisadores com modelos para tratamentos dos mesmos distúrbios (CHAZAN; PEREZ, 2012).

Dentre as complicações a Hipertensão Arterial é uma das mais prevalentes, sendo também precursora de outras doenças mais graves como o Acidente Vascular Cerebral (AVC) e o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM). A associação dessas doenças circulatórias e cardiovasculares com o DM agrava em muito a possibilidade de morbimortalidade (SCHIMIDT et al.; 2009; YOUNG et al., 2009; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; KRAMER et al. 2013).

Complicações macrovasculares levam ao aparecimento de cardiopatia isquêmica, doença arterial periférica e doença cerebrovascular nos pacientes portadores de DM1 (FOX et al., 2004; SOEDAMAH-MUTHU et al., 2006; KRAMER et al. 2013; MUHLESTEIN et al., 2014).

A compreensão das lesões ateroscleróticas tem levado à elucidação dos mecanismos metabólicos e inflamatórios, ligados ao metabolismo dos lipídeos que é alterado pela presença do diabetes nos pacientes. O progresso nessa área de conhecimento tem levado à redução dos processos de morte em pacientes diabéticos com doenças cardiovasculares (BUSE et al., 2007; GREENLAND; ALPERT; BELLER, 2010; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014;

MUHLESTEIN et al., 2014). Pacientes que demonstram riscos diminuídos devido a prevenção e tratamento do DM, colaboram para diminuição da incidência e mortalidade por doenças cardiovasculares nos pacientes sem diabetes (EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012)

3.3.4. Retinopatia Diabética

A retinopatia diabética é uma complicação comum em pacientes que apresentam quadro de hiperglicemia prolongada, sendo com certeza uma das complicações da retinopatia diabética, a cegueira, é um dos maiores temores dos pacientes diabéticos. Sendo o DM a principal causa de cegueira não traumática e pacientes adultos (PEREIRA, 2011; FRASER; D'AMICO, 2014).

Caracteriza-se pelo extravasamento de sangue para região da mácula, região do fundo do olho responsável pela visão central detalhada. Esse extravasamento pode ser dividido em edema macular focal, quando se tem microaneurismas ou edema macular difuso causado pela dilatação dos capilares presentes na retina.

As lesões microvasculares causadas pela hiperglicemia são exacerbadas e os pequenos vasos do fundo do olho, por serem mais sensíveis, tornam-se alvos fáceis para o extravasamento de fluidos e consequente formação do edema na região da retina (PEREIRA, 2011; MCCULLOCH, 2012; FRASER; D'AMICO, 2014).

3.3.5. *Neuropatia Diabética*

O acometimento neurológico de pacientes diabéticos apresenta uma série de sítios, sendo que os mais comuns são: oftalmológicos, neurológicos e nefrológicos. Os casos de neuropatia diabética apresentam lesões de axônios e fibras nervosas que podem ser acometidas por danos provenientes do estresse oxidativo, causado pelo aumento da formação de radicais livres, que também funciona como mecanismo patogênico importante (LAPOLLA et al., 2007; ANG et al., 2014).

A neuropatia diabética ocasiona a perda de transmissões sensoriais de extremidades, principalmente nos pés, que pode causar transtornos das estruturas ósseas e articulares, modificando o equilíbrio estático e dinâmico dos acometidos. É comum os pacientes portadores de neuropatias diabéticas apresentarem lesões focais ou generalizadas que acometem capacidades sensitivo-motoras e autonômas (THOMALLEY, 2007; REZENDE et al., 2009; IBRAHIM; ISLAM, 2014).

O termo “pé diabético”, lesão causada por neuropatia em pacientes com DM, acometem membros inferiores após traumas causados principalmente por objetos pontiagudos e contusão. Essa lesão causa úlceras de difícil cicatrização, que se tornam infectadas quando não tratadas e apresentam grande extensão de tecido necrótico, desenvolvida pela tríade: neuropatia periférica, doença arterial periférica e infecções. Esses casos de comprometimento de pacientes diabéticos são responsáveis por grande parte dos internamentos, que evoluem muitas vezes para amputações (REZENDE, 2009; JUDE; ELEFHERIADOU; TENTOLOURIS, 2010).

3.3.6. Nefropatia Diabética

A nefropatia é definida como lesão do tecido renal que pode resultar em insuficiência renal crônica, potencialmente fatal. A progressão da doença ao longo do tempo faz com que a capacidade renal fique diminuída e leve a quadros característicos de nefropatia: 1) microalbuminúria, denominada nefropatia silenciosa, caracterizada por índices detectáveis de albumina urinária; 2) macroalbuminúria, aumento da excreção de albumina desencadeando a nefropatia (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; GROSS, 2015; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

As lesões renais no diabetes em geral estão associadas a lesões microvasculares que contribuem de maneira significativa para alterações na matriz mesangial do glomérulo, com casos de nódulos de Kimmelstiel e Wilson.

Em casos mais graves podem ser observados: espessamento das membranas basais dos capilares glomerulares e da cápsula de Bowman; acúmulos de material hialinos nas arteríolas; e a degeneração das células tubulares com acúmulo de glicogênio (degeneração glicogênica)⁷². Essas lesões renais são causadas, na sua maioria, por picos de hiperglicemia que levam a danos vasculares microscópicos, contribuindo para a desestruturação da homeostasia renal, com quatro tipos diferentes de alterações básicas, quando comparados animais diabéticos e não diabéticos (DUNNILL, 1976; DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

- Acúmulo de glicogênio nas células tubulares nos animais diabéticos;
- Arteriosclerose em graus avançados nos animais diabéticos;

- Aumento dos casos de pielonefrite aguda e crônica em animais diabéticos;
- Aumento no número de casos de glomeruloesclerose intercapilar.

3.3.7. Lesões Pancreáticas

As células pancreáticas são responsáveis pela produção de hormônios utilizados na metabolização da glicose.

O hormônio hiperglicemiante glucagon é produzido pelas células α e o hormônio hipoglicemiante insulina pelas células β . Os dois tipos celulares encontram-se nas ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, localizadas na região caudal do pâncreas (DUNNILL, 1976; BRASIL, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Lesões das células pancreáticas são responsáveis pela diminuição ou ausência total produção desses hormônios. Histologicamente podemos destacar como principais alterações: degeneração hialina, fibrose das ilhotas de Langerhans, degeneração hidrópica e morte celular.

4. MODELOS EXPERIMENTAIS UTILIZADOS EM ANIMAIS DIABÉTICOS TIPO 1

O estudo do DM1 em animais tem sido desenvolvido largamente na pesquisa acadêmica. Para sua exiguidade, dois modelos experimentais podem ser utilizados: o DM induzido quimicamente ou o DM espontâneo (EKOE et al., 2008; BRASIL, 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

4.1. Diabetes Mellitus induzido quimicamente

A indução química do DM em animais acontece com a utilização de produtos químicos capazes de lesionar as células β pancreáticas de maneira seletiva, e dose-dependente. Dentre os produtos mais utilizados temos a Estreptozotocina (STZ) e a Alloxana (SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A STZ é uma glicosamina-nitrosureia que apresenta efeito citotóxico direto sobre as células β pancreáticas que possuem o transportador de glicose GLUT-2. Esta substância induz lesões no DNA pela alcalinização e ativação da poli-ADP ribose sintetase causando a depleção rápida e letal da Nicotina Adenina Dinucleotídeo (NAD) diminuindo os níveis de ATP nas células lesadas que causa a diminuição da síntese e secreção da insulina e instalação do DM1. Sugere-se ainda que a instalação de um ambiente oxidativo no pâncreas colabore para a destruição das células β pancreáticas participando de modo efetivo para o efeito diabetogênico da STZ (EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

O modelo experimental utilizado em nosso laboratório, do DM1 induzido através da utilização de STZ, produz danos permanentes as células β pancreáticas, garantindo a eficiência do modelo experimental.

4.2. Diabetes Mellitus espontâneo

O estudo do DM espontâneo em geral é realizado em animais que apresentam dois fatores patogênicos específicos: a predisposição genética e alterações imunológicas. Alguns modelos animais já estudados apresentam características importantes do desenvolvimento do DM1, no entanto, sua comparação com características da doença em humanos tem apresentado diferenças que desestimulam a utilização, caso dos Hamstes Chino e de coelhos brancos da Nova Zelândia (EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Outros dois tipos animais – ratos *Biobreading (BB)* e camundongos *Non Obese Diabetic (NOD)* – tem apresentado características da doença muito interessantes quando comparados a DM1 humanos e sua utilização em pesquisas laboratoriais tem sido estimulada (ONKAMO, 1999; EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Ratos BB mantidos em biotérios livres de patógenos tem apresentado incidência de 100% para do desenvolvimento do DM1 a partir do terceiro mês de vida, apresentando características clínicas clássicas como a glicosúria, perda de peso, polúria, cetoácidos e polidipsia. Esse modelo tem como característica a lesão das células β pancreática a partir da ação de linfócitos T com a produção de anticorpos anti-células β pancreática. Dessa maneira tratamentos que modulam a

ativação dos linfócitos T tem apresentado resultados promissores para o tratamento do DM1 (EKOE et al., 2008; SANTOS et al., 2012; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

5. CATUABA

As plantas brasileiras conhecidas e utilizadas como “catuaba” são representadas por mais de 10 espécies diferentes: *Tommadeniaviolaceae* (Apocynaceae), *Tetragastria catuaba* (Burseraceae), *Secundatiafloribunda* (Apocynaceae), *Pouteria* Aubl (Sapotaceae), *Phyllanthusnobilis* (L. f.) Müll. Arg (Euphorbiaceae), *Anemopaegma arvense* (Vell.) (Bignoniaceae), *Erythroxylum catuaba* e *E. acciniifolium* Mart. (Erythroxylaceae) e *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). Apesar da problemática apresentada sobre a denominação popular destas espécies, a planta encontrada mais comumente no Brasil como “catuaba” é a espécie vegetal *Trichilia catigua* (MARQUES, 1998).

A espécie *Trichilia catigua* A. Juss. pertencente à família Meliaceae, tem vasta distribuição na América do Sul e Central, sendo mais abundante no sul do Brasil⁷⁴.

Constitui-se numa árvore de 10 m de altura, sendo que os ramos novos pubescentes tornam-se glabros com a idade e de coloração acinzentada. As folhas são compostas por 5 a 7 folíolos, são curto-pediceladas, oblongo-elípticas, ápice acuminado, irregularmente agudos na base de até 7 cm de comprimento. As flores podem apresentar coloração branco-amarelada e o fruto é constituído de uma cápsula estreito-oblonga, com pêlos longos rijos e amarelados com aproximadamente 2 cm de comprimento, avermelhado e com apenas uma semente, aparecendo de dezembro a janeiro. A época de floração é de setembro a outubro, entretanto, a cápsula pode permanecer na árvore por 5 a 6 meses antes de florescer (KLEIN, 1984).

A *T. catigua* fornece madeira vermelha, compacta, sólida, flexível, bastante resistente às intempéries, própria para obras externas, marcenaria, carroçaria, torno, carpintaria e excelente lenha; peso específico 0,600 a 0,640. A casca é fina, lisa, amarga e adstringente, servindo para curtume e dando aos couros cor amarela muito apreciada. Também fornece matéria tintorial que vai do amarelo-laranja intenso até o vermelho e o violeta (KLEIN, 1984).

T. catigua é popularmente conhecida como catuaba ou catiguá e suas cascas são utilizadas na medicina popular como tônico para tratamento de fadiga, estresse, impotência sexual e déficits de memória. Alguns estudos químicos indicaram a presença de omega-fenilalcanos, ácidos omega-fenilalcanóicos, omega-fenil-gama-lactonas, alquil-gama-lactonas, alcenil-gamalactonas e ácidos graxos, além de β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e uma mistura de flavalignanas, em extratos de *T. catigua* (SOUZA et al. 2001).

O solvente acetato de etila tem sido utilizado para realização da extração dos componentes fitoquímicos da casca da *T. catigua*, sendo demonstrado ser o mais eficiente. Longhini et al. (2013) validou os componentes extraídos através de testes realizados por HPLC no extrato de catuaba, sendo que na fração acetato de etila (FAE) há presença de componentes fenólicos como a taninos, procianidina B2 (PB2), epicatenina, chinchocainas Ia, Ib, IIa, IIb, catenina e ácido clorogênico. Ressalta-se dessa forma que os estudos com extratos da *T. catigua* restringem-se a FAE por ser essa a única fração com efeitos biológicos.

5.1. Efeitos Biológicos da Catuaba

O extrato e frações da catuaba (*Trichilia catigua*) tem sido amplamente estudado no Brasil, com alguns estudos comprovando inúmeras atividades biológicas da planta, outros ainda em fase de experimental. Dentre as atividades biológicas mencionadas na literatura merecem destaque as atividades tripanocida, anticelulite, antiarrítmica, afrodisíaca, antidepressiva, anti-inflamatória e antioxidante dentre outras.

Sua atividade tripanocida (capacidade da planta de eliminar formas infectantes de *Tripanossoma cruzi*) foi testada em estudos *in vitro* e *in vivo*, com resultados satisfatórios para o controle e redução de formas infectantes do parasito no sangue (CORREA, 1984; VAS; MATA; CALIXTO, 1997; PIZZOLATTI, 2002a; PIZZOLATTI, et al., 2002b)

A atividade anticelulite tem sido testada continuamente *in vivo* com formas tópicas de pomadas e cremes que contem da fração acetato de etila (FAE), ressalta-se no entanto que resultados preliminares apresentam a necessidade de estudos mais aprofundados para elucidação de mecanismos de ação, atividade anti-inflamatória das formas farmacêuticas e possibilidade de desenvolvimento de casos alérgicos e de toxicidade da FAE no tecido cutâneo (CALIXTO; CABRINI, 1997; ANTUNES et al., 2001; CAMPOS et al., 2004).

A FAE apresenta capacidade de reverter a fibrilação ventricular, evitando reindução e prolongando a condução intraventricular, em corações de coelhos, tornando possível o efeito antiarrítmico que também foi estudada (CAMPOS et al., 2004).

A capacidade afrodisíaca da catuaba é popularmente conhecida e utilizada por leigos há décadas. A planta é empregada em tratamentos de impotência sexual, fadiga muscular, estresse e déficits de memória. Contribui para o tratamento da impotência sexual por atuar no relaxamento vascular e dos corpos cavernosos facilitando de maneira direta para a ereção peniana, ativa a produção de testosterona (células de Leydig), mantendo os aspectos histológicos normais das demais estruturas do sistema reprodutor masculino (PIZZOLATTI et al., 2002b; BABY ET AL., 2006).

Experimentos *in vivo* indicaram que o tratamento com o extrato das cascas de *T. catigua* produziu significativa redução do tempo de imobilidade em modelo de nado forçado em camundongos, apontando um potencial efeito antidepressivo. Estes estudos fornecem evidências de que o efeito antidepressivo é modulado por dopamina. Alterações motoras, cognitivas, ansiolíticas e antidepressivas tem sido apresentada em trabalhos recentes, além também de casos que demonstram que diferentes doses de FAE influenciam no processo de gênese neuronal em regiões do hipocampo (VAS; MATA; CALIXTO, 1997; BABY et al., 2006; LONGHINI et al., 2013).

O efeito anti-inflamatório da FAE tem sido evidenciado em estudos *in vitro*, a qual foi estabelecida a capacidade de relaxamento vascular nos animais tratados com FAE mediado pela liberação de óxido nítrico^{87,88,89}. Além de eventos vasculares o processo inflamatório inclui a presença da liberação de moléculas específicas, como o ácido araquidônico mobilizado pela fosfolipase A e a síntese de prostaglandinas. A inibição da fosfolipase A se apresenta como mecanismo específico para a diminuição do processo inflamatório, uma vez que a síntese do ácido araquidônico e das prostanglandinas estaria inibido (BARBOSA et al., 2004;

PONTIERI et al., 2007; QUINTAO et al., 2008; VIANA et al., 2009; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012).

Sabe-se, no entanto, que a *T. catigua* tem capacidade de inibir eventos dolorosos do processo inflamatório, mas não apresentou eficiência para controlar a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, TNF, PGE2 ou LTB4 (BARBOSA et al., 2004; PONTIERI et al., 2007; QUINTAO et al., 2008; VIANA et al., 2009; CHASSOT et al., 2011; BONASSOLI et al., 2012).

A ingestão de alimentos antioxidantes é primordial para a diminuição das reações oxidativas e de suas consequências. Dentre os compostos químicos naturais que apresentam melhor capacidade antioxidante destacam-se os taninos e flavonoides. A *T. catigua* apresenta na composição de seus extratos a presença de diferentes tipos dessas substâncias. A capacidade antioxidantes já foi demonstrada contra o anion superóxido e o radical hidroxila. A presença de cinchocainas e catiguaninas sustenta a hipótese de que a FAE apresenta capacidade antioxidantes (DATNER, 1999; MELLO et al., 2003; BRIGHENTE et al., 2007; ALBRECHT et al., 2007; TANG et al., 2007).

Em estudo de isolamento de substâncias do extrato bruto de *T. catigua*, foi averiguada a capacidade antioxidante de sete substâncias (epicatequina, procianidina B2, cinchononas Ia, Ib, IIa e IIb, e pro-cianidina C1), sendo que todas elas apresentaram efeito antioxidantes maior que o Trolox e a Vitamina C, sendo que prociadina C1 foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante, seguida de cinchononas Ib, IIa, IIb e Ia, a pro-cianidina B2 e a epicatequina, respectivamente (ALBRECHT, et al., 2007; RESENDE et al., 2011). Em estudos mais recentes, a FAE foi testada com capacidade antioxidante superior à de substâncias conhecidas como as vitaminas C e E (TANG, 2007; CHASSOT et al., 2011; RESENDE et al., 2011).

6. HIPÓTESES

A utilização de compostos vegetais na proteção contra doenças crônicas tem sido estudada de maneira muito abrangente e a Catuaba (*Trichilia catigua*) tem apresentado capacidade de atuar em diferentes mecanismos protetores contra doenças crônicas.

Sendo assim, nossa hipótese é de que a Catuaba sendo administrada tenha capacidade de atenuar as alterações degenerativas decorrentes do diabetes tipo I induzido por estreptozotocina (STZ) no pâncreas e rins de animais diabéticos. Atuando como possível adjuvante das terapias já existentes para o tratamento do DM.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo Geral

O objetivo da presente Tese foi o de avaliar o efeito protetor da fração acetato de etila (FAE) da Catuaba frente a alterações metabólicas, bioquímicas, histopatológicas e do estresse oxidativo sobre os rins e o pâncreas de ratos Wistar com diabétes tipo I induzidos por estreptozotocina.

7.2. Objetivos Específicos

- Quantificar as alterações metabólicas: consumo de água, de ração e peso corporal de ratos diabéticos tratado com FAE.
- Averiguar as alterações bioquímicas presentes no sangue de animais diabéticos e o efeito protetor do FAE.
- Estudar as alterações histopatológicas presentes no pâncreas e rins de animais diabéticos tratados com FAE;
- Analisar as alterações do estresse oxidativo no rim de ratos diabéticos e o efeito protetor do FAE.

8. ARTIGOS

O presente trabalho originou dois artigos científicos que serão incluídos nessa tese como anexos. Eles foram realizados na *Universidade Estadual de Londrina - UEL*, no Laboratório de Patologia Molecular e no Laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres; *Universidade Estadual de Maringá – UEM*, Laboratório de Plasticidade Neural Entérica, Laboratório de Histologia Animal; Laboratório Palafito e no Laboratório de Análises Clínicas; *Universidade Federal de São Paulo – Unifesp – Escola Paulista de Medicina*, no Laboratório de Patologia Renal; *Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia São Camilo*; *Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia Maringá*; e *Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia Souza*.

O trabalhos serão submetidos para publicação e intitulam-se:

Artigo 1: **Hypoglycemic effect of ethyl-acetate fraction from *Trichilia catigua* in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats.**

Artigo 2: **Fração acetato de etila de *Trichilia catigua* protege animais das complicações decorrentes da nefropatia diabética**

9. CONCLUSÕES

O FAE apresenta-se como possível opção terapêutica para a melhora dos parâmetros apresentados por animais diabéticos.

Foi observada a capacidade protetiva do extrato frente as alterações metabólicas apresentadas pelos animais diabéticos, fazendo com que a perda de peso, o consumo de água e ração fossem melhorados.

Outra capacidade apresentada foi a de melhorar os parâmetros bioquímicos dos animais tratados quando comparados com animais diabéticos, sendo que foram significativas as melhoras nos valores da glicemia, função renal, função hepática e pancreática principalmente.

Foram significativas as melhoras nos padrões histopatológicos sugerindo proteção do FAE nos rins e pâncreas de animais diabéticos. A glomeruloesclerose, necrose glicogênica e deposição do colágeno foram melhoradas de maneira significativa.

Os resultados do estresse oxidativo apresentaram capacidade protetora da FAE, inibindo o desenvolvimento de produtos da peroxidação lipídica no grupo tratado com FAE. A oxidação de proteínas não foi constatada no presente estudo.

Conclui-se, portanto que o FAE apresenta-se como possível opção de adjuvante no tratamento do DM, juntamente com as terapêuticas já existentes, sendo necessário ainda mais estudos sobre a sua atividade frente ao diabetes mellitus.

Pesquisas devem ser ainda realizadas buscando a melhor elucidação da eficácia, e de implicações sobre os padrões de animais e pacientes diabéticos,

bem como sua eficiência no tratamento dos diversos tipos de diabetes, uma vez que nesse estudo pesquisamos apenas o Diabetes Mellitus Tipo 1.

10. REFERÊNCIAS

- ABREU, S. Papel da monitorização da glicemia capilar. In J. SILVA NUNES (Coord.) **Diabetes – uma abordagem global**. Algés: Euromédice, Edições Médicas, Lda. 2010. p. 155-162.
- ALBRECHT, I. et al. Avaliação da atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de cascas de *Trichilia catigua* A. Juss. Por DPPH. **Anais do I Congresso de Farmácia de Maringá**, Arq. Mudi. 11 (1), 2007.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, Suppl 1, S81-90, 2014.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards Medical Care in Diabetes—2012. **Diabetes Care**, v. 35, Suppl. 1, p. S11-S63, 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. **Diabetes Care**, v. 30, Suppl. 1, p. S11-S61, 2011.
- ANG, L. et al. Glucose control and diabetic neuropathy: lessons from recent large clinical trials. **Curr Diab Rep.**, v. 14, n. 9, p. 528, 2014.
- ANTUNES, E. et al. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. **Phytotherapy Research**, v.15, n. 5, p.416-421, 2001.
- ARYA, A.; YADAV, H. N.; SHARMA, P. L. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. **Mol. Cell Biochem.**, v. 354, n. 1-2, p. 57-66, 2011.
- ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes: progress and propect. **The Lancet**, v. 383, p. 69-82, 2014.
- ATKINSON, M. A.; MACLAREN, N. K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med.**, v. 331, n. 21, p. 1428-1436, 1994.
- BABY, A. R. et al. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 3, p. 405-412, 2007.
- BABY, A. R. et al. UV-spectrophotometric determination of bioflavonoids from semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Bentham standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. **J. AOAC Int.**, v. 89, n. 6, p.1532-1537, 2006.
- BAKKER, K.; APELQVIST, J.; SCHAPER, N. C. Practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot 2011. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 28, n. (Suppl 1), p.225-231, 2012.
- BARBOSA, N. R et al. Inhibition of platelet phos-pholipase A2 activity by catuaba extract suggests antiinflammatory properties. **Phytother. Res.**, v. 18, n. 11, p. 942–944, 2004.
- BARNETT, D. M.; KRALL, L. P. A história do diabetes. In KAHN, C.R. et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, cap. 1, p. 15-31, 2009.
- BOAVIDA, J. M.; GARDETE-CORREIA, L.(Coord). **Como usar a insulina**. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, Lda. 2005.

- BONASSOLI, V. T. et al. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 143, n. 1, p. 179-184, 2012.
- BONNER-WEIR, S. et al. Life and death of the pancreatic beta cells. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 11, n. 9, p. 375-378, 2000.
- BOSI, P. L. et al. Prevalência de diabetes mellitus e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n. 6, p. 726-732, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica : diabetes mellitus / Ministério da Saúde. **Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica.** – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 160 p.
- BRIGHENTE, I. M. C. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of some brazilian species. **Pharm. bio.**, v. 45, n. 2, p. 156-161, 2007.
- BUSE, J. B. et al. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with DM: a scientific statement from the american heart association and the american diabetes association. **Diabetes Care**, v. 30, n. 1, p.162-72, 2007.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D. A. Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and –independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytother. Res.**, v.11, n. 1, p. 32-38, 1997.
- CAMPOS, M. M. et al. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.78, n. 4, p.757–764, 2004.
- CARVALHO, D.; DELGADO, E. Melhor gestão da diabetes: como transformar números em decisões clínicas. **Patient Care**, edição portuguesa, suplemento: 1-7, 2013.
- CHASSOT, J.M. et al. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 3, p. 1143– 1148, 2011.
- CHAZAN, A. C.; PEREZ, E. A. Avaliação da Implementação do Sistema Informatizado de Cadastramento e Acompanhamento de Hipertensos e Diabéticos (Hiperdia) Nos Municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Rev. APS**, v. 11, n. 1, p. 10-16, 2008.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.3, p.545-555, 1984
- CORREIA, L. G.; RAPOSO, J. F.; BOAVIDA, J. M. (coords.). **Viver com a diabetes**, 3ª edição. Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, Lda. 2012.
- CORREIA, L. G.; RAPOSO, J. F.; BOAVIDA, J. M. **Viver com a diabetes**, 3ª edição. Associação Protectora dos Diabéticos de Portugal. Lisboa: Lidel Edições Técnicas, Lda. 2012.
- CRIER, P. E. Hypoglycemia in diabetes. In Holt, R. I. G., Cockram, C. S., Flyvbjerg, A. & Goldstein, B. J. (eds) **Textbook of Diabetes**, 4th edition (pp. 528-545). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2010.
- Daneman, D. Type 1 Diabetes. **Lancet**, v. 367, n. 9513, p. 847-858, 2006.

- DATTNER, A.M. Nutritional dermatology. **Clin. Dermatol.**, v.17, n. 1, p. 57-64, 1999.
- DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Results of Feasibility Study. **Diabetes Care**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 1987.
- DCCT RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progress of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 977-986, 1993.
- Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
- DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES: 2013-2014/**Sociedade Brasileira de Diabetes** ; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.
- DUARTE, R. A1c ou glicemia média: uma proposta para implementação da nova tabela de referência da equivalência A1c com a glicemia média. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 3, n. 3, p. 164, 2008.
- DUARTE, R.; GÓIS, C. Diabetes na adolescência. In R. DUARTE (coord.), **Diabetologia clínica** (pp. 243-250). Lisboa: Lidel Edições Técnicas. 2002.
- DUNNILL, M.S. **Pathological Basis of Renal Disease**. Oxford. 1976
- EKOÉ, J. M. et al. **The epidemiology of diabetes mellitus**. 2. ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 2008.
- FOX, C. S. et al. Trends in cardiovascular complications of diabetes. **JAMA**, v. 292, n. 20, p. 2495-9, 2004.
- FRASER, C. E.; D'AMICO, D. J. Prevention and treatment of diabetic retinopathy. UpToDaTe, 2012 / Cunha-Vaz J, Ashton P, Iezzi R et al. FAME Study Group. Sustained delivery fluocinolone acetonide vitreous implants: longterm benefit in patients with chronic diabetic macular edema. **Ophthalmology**, v. 121, n. 10, p.1892-903, 2014.
- GARVEY, K. C.; MARKOWITZ, J. T.; LAFFEL, L. M. B. Transition to adult care for youth with type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 5, p. 533-541, 2012.
- GARVEY, K. C.; MARKOWITZ, J. T.; LAFFEL, L. M. B. Transition to adult care for youth with type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 12, n. 5, p. 533-541, 2012.
- GREENLAND, P.; ALPERT, J. S.; BELLER, G. A. et al. ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 56, n. 25, p. e50-103, 2010.
- GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. Bras. End. Metab.**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.
- GROSS, J.L. et al. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. **Diabetes Care**, v. 28, n.1, p. 164-176, 2005
- HANAS, R. **Diabetes tipo 1 em crianças, adolescentes e jovens adultos**. 3ª edição. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas. 2007.
- HOLT, T.; KUMAR, S. **ABC da Diabetes**. Lisboa: Reza a História Edições. 2010.

HU, F. B. Globalization of Diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v. 34, n. 6, p. 1249-1257, 2011.

IBRAHIM, M. A.; ISLAM, M. S. 2014- Anti-diabetic effects of the acetone fraction of *Senna singueana* stem bark in a type 2 diabetes rat model. **J Ethnopharmacol**, v. 153, n. 2, p. 392-399, 2014.

IMAGAWA, A. et al. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **N Engl J Med.**, v. 342, n. 5, p. 301-307, 2000.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas, 6th edn.** Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR PEDIATRIC AND ADOLESCENT DIABETES (ISPAD). (2009). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2009 Compendium. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. **Pediatric Diabetes**, 10 (12): 71–81

INZUCCHI, S. E. et al. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: A Patient-Centered Approach. **Diabetes Care**, v. 35, n. 6, p. 1364-1379, 2012.

JUDE, E. D.; ELEFThERIADOU, I.; TENTOLOURIS, N. Peripheral arterial disease in diabetes—a review. **Diabet Med.**, v. 27, n. 1, p. 4-14, 2010.

KLEIN, R.M. **Flora Ilustrada Catarinense – Meliáceas**, Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 55-60, 1984.

KRAMER, C. K. et al. Coronary artery calcium score prediction of all cause mortality and cardiovascular events in people with type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 346, p. f1654, 2013.

LAPOLLA, A. et al. AGES and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral arterial disease. **Diabetes Care**. v. 30, n. 3, p. 670-678, 2007.

LAWTON, J. et al. Self-treating hypoglycaemia: a longitudinal qualitative investigation of the experiences and views of people with type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 30, n. 2, p. 209-215, 2012.

LONGHINI, R. et al. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Jornal Separation of Science**, v. 36, n. 7, p.1247–1254, 2013.

MARITIM, A. C.; SANDERS, R. A.; WATKINS, J. B. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 17, n. 1, p. 24-38, 2003.

MARQUES, L.C. Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. **Revista Racine**, v.3, n. 43, p.8-11, 1998.

MCCULLOCH, D. K. Pathogenesis of diabetic retinopathy. UpToDaTe, 2012 / Elman MJ, Bressler NM, Qin H, B4eck RW, Ferris FL 3rd, Friedman SM et al. Diabetic Retinopathy Clinical Research Network. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. **Ophthalmology.**, v. 118, n. 4, p. 609-14, 2011.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (org.)

Farmacognosia da planta ao medicamento. 6. ed. 1ª. reimpr., Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS, Ed. Da UFSC, Cap. 24. p. 517-544, 2003.

MUHLESTEIN, J. B. et al. Effect of screening for coronary artery disease using CT angiography on mortality and cardiac events in high-risk patients with diabetes: the FACTOR-64 randomized clinical trial. **JAMA.** v. 312, n. 21, p. 2234-243, 2014.

NATHAN, D. The Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 9-16, 2014.

OBSERVATÓRIO NACIONAL DA DIABETES. **Diabetes: Factos e números 2013.** Lisboa: Sociedade Portuguesa de Diabetologia. 2013.

ONKAMO, P. et al. Worldwide increase in incidence of type 1 diabetes: the analysis of the data on published incidence trends. **Diabetologia.** v. 42, n. 12, p. 1395-1403, 1999.

PATTON, S. Adherence to diet in youth with type 1 diabetes. **Journal of the American Dietetic Association.** v. 111, n. 4, p. 550-555, 2011.

PEREIRA, M. G. Importância da avaliação familiar na doença. In Rebelo, L. **A família em Medicina Geral e Familiar.** (pp. 63-76). Lisboa: Health and Pharma Publishing. 2011.

PIHOKER, C. et al. Insulin Regimens and Clinical Outcomes in a Type 1 Diabetes Cohort: The SEARCH for Diabetes in Youth study. **Diabetes Care**, v. 36, n. 1, p. 27-33, 2013.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v.9, p.422-426, 2003b.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. **Zeitschrift der Naturforschung**, v. 57, n. 5-6, p.483-488, 2002a.

PONTIERI, V. et al. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. **J. Electrocardiol.**, v. 40, n. 6, p.534-534, 2007.

QUINTÃO, N. L. M. et al. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama® in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. **Phytomedicine**, v. 15, n. 4, p. 245-252, 2008.

RAIMUNDO, L. Diabetes mellitus na infância e adolescência. In J. Silva Nunes (Coord.) **Diabetes – uma abordagem global** (pp. 155-162) Algés: Euromédice, Edições Médicas, Lda. 2010.

REACH, G. Patient autonomy in chronic care: solving a paradox. **Patient Prefer Adherence**, v. 8, p. 15-24, 2014.

RESENDE, F.O. et al. Phenylpropanoids substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 11, p. 2087-2093, 2011.

REZENDE, K. F. et al. Direct costs and outcomes for inpatients with DM and foot ulcers in a developing country: The experience of the public health system of Brazil. **Diabetes Metabol Syndrome: Clinical Res**, n. 3, p. 228-32, 2009,

- RINTALA, T. M. et al. Everyday life of a family with diabetes as described by adults with type 1 diabetes. **European Diabetes Nursing**, v. 10, n. 3, p.86-90, 2013.
- SANTOS, M. A. et al. Percepção de Pacientes com Diabetes *Mellitus* Tipo 1 Sobre o Transplante de Células-tronco Hematopoéticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 28, n. 4, p. 425-433, 2012.
- SANTOS, V. et al. Diabetes *Mellitus* tipo 1 em idade pediátrica: a experiência de 20 anos de consulta. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 6, n. 3, p. 105-109, 2011.
- SARAIVA, C. Complicações agudas da diabetes mellitus. In J. Silva Nunes (Coord.) **Diabetes – uma abordagem global** (pp. 179-190) Alges: Euromédice, Edições Médicas, Lda. 2010.
- SCHAPER, N. C. et al. Diagnosis and treatment of peripheral arterial disease in diabetic patients with a foot ulcer. A progress report of the International Working Group on the Diabetic Foot. **Diabetes Metab Res Rev.**, v. 28, n.(Suppl 1), p.218-24, 2012.
- SCHMIDT, M. I. et al. Prevalência de Diabetes e Hipertensão no Brasil Baseada em Inquérito de Morbidade Auto-Referida, Brasil, 2006. **Rev Saúde Pública**, v. 43, n. 2, p. 74-82, 2009.
- SOEDAMAH-MUTHU, S. S. et al. All-cause mortality rates in patients with type 1 DM compared with a non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999. **Diabetologia**, v. 49, n. 4, p. 660-666, 2006.
- SOUZA, L.A.; MOSCHETA, I.S.; MOURÃO, K.S.M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v.44, n.4, p.383-394, 2001.
- STENE, L. C. et al .Epidemiology of type 1 diabetes. In Holt, R. I. G., Cockram, C. S., Flyvbjerg, A. & Goldstein, B. J. (eds) **Textbook of Diabetes**, 4th edition (pp. 31-34). Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2010.
- TABAEI, B. P. et al. Glycemia and the quality of well-being in patients with diabetes. **Quality of Life Research**, v. 13, n. 6, p. 1153-1161, 2004.
- TANG, W. et al. Antioxidant phenylpropanoid-substituted epicatechins from *Trichilia catigua*. **J. Nat. Prod.**, v.70, n. 12, p. 2010– 2013, 2007.
- THABIT, H.; HOVORKA, R.; EVANS, M. Artificial pancreas: the bridge to a cure for type 1 diabetes. **European Diabetes Nursing**, v. 9, n. 2, p. 56-60, 2012.
- THABIT, H.; HOVORKA, R.; EVANS, M. Artificial pancreas: the bridge to a cure for type 1 diabetes. **European Diabetes Nursing**, v. 9, n. 2, p. 56-60, 2012.
- THORNALLEY, P. J. et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. **Diabetologia**, v. 50, n. 10, p. 2164-2170, 2007.
- VAS, Z. R.; MATA, L. V.; CALIXTO, J. B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. **Phytotherapy Research**, v.11, n. 2, p.101- 06, 1997
- VIANA, A. F. et al. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. **eCAM**, p. 1-8, 2009.

YOUNG, L. H. et al. Cardiac outcomes after screening for asymptomatic coronary artery disease in patients with type 2 diabetes: the DIAD study: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 301, n. 15, p.1547-55, 2009.

11. ANEXOS

ARTIGO 1

O presente artigo foi concebido e elaborado conforme as regras do periódico:

Cellular Physiology and Biochemistry

Classificação do Periódico na Avaliação de Periódicos Qualis da CAPES:

A1

Fator de impacto:

5,104

Anti-Diabetic Effects of the Ethyl-Acetate Fraction of *Trichilia catigua* in Streptozotocin-Induced Type 1 Diabetic Rats

Luis Fernando de Paulo^a; Rodrigo Mello Gomes^b; Cynthia Priscilla do Nascimento Bonato Panizzon^c; Camila Quaglio Neves^c; Bruna Colombo Cordeiro^c; Jacqueline Nelisis Zanoni^c; Paulo Cezar de Freitas Mathias^d; Renata Longhini^e; João Carlos Palazzo de Mello^e; Júlio Cezar de Oliveira^f; Maria Raquel Marçal Natali^c and Alessandra Lourenço Cecchini^a

^a Department of General Pathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Department of Physiological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia/GO, Brazil

^c Department of Morphological Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

^d Department of Cell Biology, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

^e Laboratory of Pharmaceutical Biology, Palafito, Maringá, Brazil

^f Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, Sinop, MT, Brazil

Key words: Diabetes, Nephropathy, Pancreatic islets; β -cell; Antioxidants, *Trichilia catigua*.

Abstract

Background/Aims: *Trichilia catigua* A. Juss., known as “catuaba” in Brazil, has been popularly used as a tonic for fatigue, impotence and memory deficits. Previously, our group demonstrated that the ethyl-acetate fraction (EAF) of *T. catigua* has antioxidant and anti-inflammatory effects. The present study evaluated the anti-diabetic activity of EAF in type 1 diabetic rats. **Methods:** Male Wistar rats were divided into four groups (N: non-diabetic group, D: type 1 diabetic group, NC: non-diabetic + EAF group and DC: type 1 diabetic + EAF group). The latter two groups were treated with 200 mg/kg EAF. Type 1 diabetes was induced by intravenous streptozotocin (STZ) injection (35 mg/kg). Starting two days after STZ injection, EAF was administered daily by gavage for 8 weeks. **Results:** EAF attenuated body mass loss and reduced food and water intake. EAF improved hyperglycaemia and other biochemical parameters, such as alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). Furthermore, the number of pancreatic β -cells and the size of the islets had increased by β -cell proliferation in the DC group. EAF promoted reduction in kidney tissue damage in STZ-induced diabetic rats by reduction of renal fibrosis. **Conclusion:** The present study showed that EAF improves glucose homeostasis and endocrine pancreas morphology and inhibits the development of diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rats.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic non-communicable disease that results in chronic hyperglycaemia. Type 1 DM is characterized by pancreatic β -cell apoptosis and massive reduction in the number and area of the pancreatic islets [1-3]. In 2015 alone, this pathology affected 415 million people worldwide, caused 5.0 million deaths and cost 673 billion dollars from public coffers worldwide [4].

Chronic hyperglycaemia leads to elevated production of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative/inflammatory activities. In this way, DM is associated with tissue injuries leading to a risk of cardiometabolic diseases and their related complications as long-term consequences, which include ketoacidosis, neuropathy, retinopathy, cardiovascular disorders and nephropathy [5].

Natural products with antioxidant activity have been used for the treatment of DM and diabetic nephropathy [6-8]. In addition, polyphenolic compounds, flavonoids, tannins, anthocyanins and other phenolic constituents prevent oxidative damage and several degenerative diseases [9, 10]. *Trichilia catigua* A. Juss., known as “catuaba” in Brazil, has been popularly used as a tonic for fatigue, impotence and memory deficits. It has been demonstrated that the ethyl-acetate fraction (EAF) of *T. catigua* has antioxidant and anti-inflammatory effects [10-12].

Previously, our group reported the antioxidant capacity of EAF from the bark of *T. catigua*, where nine polyphenolic constituents with antioxidant effects were found [11, 13]. Furthermore, subchronic treatment with EAF promoted an antidepressant effect as well as increased hippocampal cell proliferation in mice [12]. In addition, *T. catigua* treatment provided significant neuroprotection in cerebral ischaemia-reperfusion, and this effect may be attributed to a reduction in reactive

oxygen species (ROS) generation [14]. However, the protective mechanism of *T. catigua* against diabetes remains to be further clarified. Thus, considering the broad pharmacological effects attributed to *T. catigua* preparations, especially EAF, we hypothesize that EAF has potentially beneficial effects against type 1 DM, caused by pancreatic β -cell apoptosis, and its related complications such as nephropathy. In this study, we aimed to investigate the anti-diabetic effect of EAF from *T. catigua* and whether this preparation can attenuate the development of diabetic nephropathy in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetic rats.

Materials and methods

Plant material and extract preparation

The plant material and crude extract were prepared from the powdered bark of *T. catigua* as previously described [15]. The crude extract was dissolved in water, and EAF was isolated using an ethyl-acetate solution as previously described [13, 16].

The quality of the EAF was evaluated by measuring the amounts of procyanidin B2 (PB2) and epicatechin (EPC) in this fraction against analytical standards by HPLC analysis (Thermo®, San Jose, CA, USA), according to a method developed and validated by our group, as previously described [16]. These standards were chosen for validation because they were available in the appropriate quantities at the laboratory. We solubilized 5 mg of EAF in 3 mL of methanol-water solution (2:8; v/v) and then purified it with a solid-phase extraction cartridge (SPE, SampliQ C18, Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA) preconditioned with methanol and water. Subsequently, the samples were transferred to a volumetric flask, and the total volume was brought to 10 mL with methanol-water solution (2:8; v/v). The samples were processed in triplicate.

Analysis was performed on an HPLC system with a photodiode array (PDA) spectrophotometric detector module (Model Finnigan Surveyor PDA Plus Detector), integral pumps and degasser (Finnigan Surveyor LC Pump Plus), and an auto sampler equipped with a 10 µL loop (Finnigan Surveyor Autosampler Plus), and the process was controlled using ChromQuest software (Thermo®, San Jose, CA, USA). The detection wavelength and flow rate were 280 nm and 0.4 mL/min, respectively. We used the Luna PFP(2) column model, 100 Å, 250 x 4.6 mm 5 µm

(Phenomenex®, Torrance, CA, USA), and a guard column (6 x 3 mm, 5 µm; Phenomenex®). The mobile phase was eluted by a gradient system that consisted of Phase A, methanolacetonitrile (75:25; v/v), and Phase B, water, both containing 0.05% trifluoroacetic acid (TFA), as follows: 0 min, 30% phase A; 36 min, 40% phase A; 38 min, 30% phase A, continued at 40 min, followed by a 2 min post-time to re-equilibrate the system.

Ethical approval

The handling of experimental animals was according to the Brazilian Law no. 11.794/2008 and approved by The Animal Ethics Committee in Animal Research of the State University of Maringá (protocol number 082/2012).

Animals and experimental design

Adult male Wistar rats, aged 80 days, were housed in the animal facility of the Department of Morphological Sciences in polypropylene cages (45 cm/30 cm/15 cm), 3 animals per cage, under controlled luminosity [12:12 h light-dark cycle (06:00-18:00 h)] and temperature ($22.0 \pm 2^{\circ}\text{C}$). All animals received standard chow (Nuvilab®, Colombo, Paraná, Brazil) and water ad libitum. Food and water intake were evaluated daily, and body weight (BW) weekly.

After one week of adaptation, the animals were divided into four groups (n = 12 animals/group): (N) non-diabetic group, (D) type 1 diabetic group, (NC) non-diabetic + EAF group, and (DC) type 1 diabetic + EAF group.

Induction of experimental diabetes

Type 1 DM was induced by a single injection (35 mg/kg BW, i.v.) of STZ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in citrate buffer (0.1 mol/L, pH 4.5) into the penile vein, performed after overnight fasting and under anaesthesia (sodium thiopental; 40 mg/kg BW, i.p.). Diabetes was confirmed 48 h after STZ injection, and the animals that showed fasting blood glucose >350 mg/dL were considered diabetic. Blood samples were obtained from a small cut in the tail vein and measured using a glucometer (ACCU-CHEK® Advantage, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

EAF treatment

The animals from the NC and DC groups were treated daily with EAF orally administered by gastric gavage (200 mg/kg of BW) for 8 weeks. The EAF was diluted in a drop of glycerin and 0.9% NaCl saline solution (100 mg of EAF in 1 mL of vehicle). The dilution was performed immediately prior to the treatment, and the volume administered was 2 mL/kg of BW. Animals from non-treated groups received vehicle solution without EAF. The treatment occurred between 4:00 and 5:00 p.m.

Euthanasia and sample collection

At the end of the treatment period and after overnight fasting, the animals were anaesthetized with sodium thiopental (i.p. 40 mg/kg BW) for blood sample collection through cardiac puncture. Blood samples were collected into tubes without anticoagulant and centrifuged (3000 rpm for 5 min), and the serum was stored at -80 °C for further analyses. Subsequently, the animals were euthanized,

and samples of the soleus muscle, retroperitoneal and periepididymal adipose tissue, pancreas and left kidney were removed and weighed.

Biochemical analysis

Blood samples were used for measurement of blood glucose by the glucose oxidase technique (Gold Analisa® Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) and of creatinine, uric acid, total protein, albumin, globulin, amylase, alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transferase (GGT) by enzymatic colorimetric methods (Gold Analisa®) according to the manufacturer's instructions.

Determination of retroperitoneal periepididimal fat and soleus muscle weight

Laparotomy was then performed to remove and weigh retroperitoneal and periepididymal adipose tissues and sole muscle. The retroperitoneal and periepididymal fat deposits and sole muscle were weighed and expressed in g per 100 g of body weight (BW).

Histological analysis of the endocrine pancreas

Pancreas samples were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated, embedded in histological paraffin and sectioned (5 µm) in non-serial cuts. The tissue sections were deparaffinized, rehydrated and blocked against endogenous peroxidase, washed in 0.01 mol/L phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) and incu

bated with 10% non-immune goat serum blocking solution (Histostain-Plus®, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 10 min. They were then incubated with monoclonal primary antibodies against insulin (1:500, Sigma®, St. Louis, MO, USA) or against PCNA (1:100, Zymed®, San Francisco, CA, USA) for 60 min. After being washed (0.01 mol/L PBS), sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (HistostainPlus®) for 10 min, washed and incubated with diaminobenzidine chromogenic solution (Histostain-Plus®) for 15 min, washed again, and finally counterstained with haematoxylin. The morphometric analyses were performed using digital images (TIFF 24-bit colour, 2560 × 1920 pixels) obtained with a light microscope (Olympus BX41, Tokyo, Japan) and a camera QColor 3 Olympus. Quantitative analyses of the islets number were performed using digital images (×20 magnification) of 6 different fields from each animal (n = 6 animals/group). Analyses of islet area, islet insulin immunodensity and PCNA-positive cells were performed using 40 digital images (×400 magnification) from each animal (n = 6 animals/group). These analyses were performed using Image-Pro Plus 4.5 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Statistical analysis

Data were expressed as means ± standard error of the mean (SEM). After analyzing the distribution of normality, using the Kolmogorv-Smirnov test, with all data presenting a normal distribution, the values were submitted to analysis of one-way variance (ANOVA) with the Tukey post test, showing significant differences between the values The different groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analysis and confection charts were performed using

GraphPadPrism Software Version 6.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Results

Chromatographic analysis of EAF

The chromatogram of EAF is showed in Figure 1. The determination of PB2 and EPC in the EAF samples were 37.2 ± 0.84 and 20.3 ± 0.74 $\mu\text{g/mL}$, respectively. On the other hand, in the EAF analytical solution, the PB2 and EPC determination were 74.4 and 40.6 mg/g, respectively.

*Effect of EAF from *T. catigua* on body weight gain*

The STZ-diabetic rats showed loss body weight throughout experimental period compared to non-diabetic rats (Fig. 2A; $p<0.05$). This result can be seen by decreasing in body weight gain (178%; Fig. 2B). The EAF treatment attenuated the body weight loss from the fifth to 8th weeks of treatment in the DC group.

*Effect of EAF from *T. catigua* on adipose tissue and soleus muscle*

As showedn in Figure 3A and 3B, the retroperitoneal and periepididymal fat were decreased around of 94% ($p<0.05$) in STZ-diabetic group compared to non-diabetic rats. On the other hand, in DC group, this fat weight loss was diminue in both adipose tissue by EAF. The STZ-diabetic group had reduction in soleus muscle mass by 39% ($p<0.05$). However, the EAF treatment was able on diminue this parameter by 25% in DC group (Fig. 3C; $p<0.05$).

Effect of EAF from T. catigua on food and water intake

Figures 4 and 5 illustrate the effect of EAF on food and water intake, respectively. Non-diabetic groups (N and NC groups) showed similar curves of food and water intake (Fig. 4A and 5A, respectively). STZ-diabetic rats showed higher food and water intake throughout experimental period compared to control ones ($p < 0.05$). The area under curve (AUC) of food and water intake increased by 64% and 361%, respectively in STZ-diabetic group compared to non-diabetic group (Fig. 4B and 5B, respectively; $p < 0.05$). Interestingly, treatment with EAF improved the higher food and water intake, by reducing it around of 23% and 42%, respectively in DC group ($p < 0.05$).

Effect of EAF from T. catigua on biochemical analysis

Table 1 showed the effect of EAF on biochemical parameters. Blood glucose concentration was higher in STZ-diabetic rats compared to non-diabetic rats (403%; $p < 0.05$). However, EAF treatment reduced significantly (24%) blood glucose in DC group ($p < 0.05$).

STZ-diabetic rats exhibited amylase serum levels increased significantly in STZ-diabetic rats when compared to non-diabetic rats ($p < 0.05$). Nevertheless, EAF treatment improved these parameters in DC group.

STZ-diabetic rats showed significant decrease in serum levels of the total protein (19%), albumin (13%) and globulin (28%). Oral treatment with EAF reversed these parameters in DC group. Furthermore, ALP, AST, ALT and GGT were significantly increased in the serum from STZ-diabetic rats when compared to control

rats ($p<0.05$). EAF treatment promoted an accentuated reduction in these enzymes in DC group ($p<0.05$).

Effect of EAF from T. catigua on histological analysis of endocrine pancreas

The histopathological examination of the endocrine pancreas revealed a large reduction in pancreatic β -cell amount and in the size and number of pancreatic islets in STZ-diabetic group compared to non-diabetic group (Fig. 6A–6H). The quantitative morphometric analyses revealed a significant reduction in pancreatic islet number, islet area and islet insulin immunodensity (Fig. 6I, 6J and 6K; $p<0.05$). Moreover, the pancreatic islets from STZ-diabetic group showed uneven distribution of pancreatic β -cells as can be seen in the Fig. 6F. Interestingly, EAF treatment improved significantly the pancreatic islet number, islet area and islet insulin immunodensity in DC group and did not change these parameters in NC group (Fig. 6I, 6J and 6K). Fig. 7 shows that the EAF induced pancreatic β -cell proliferation (PCNA positive cells) in both treated groups. The animals of the diabetic group did not present any changes in the immunoblotting for PCNA. However, the animals treated with EAF showed a higher proliferation of cells when compared with the control animals, with a higher proliferation in the animals of the DC group.

Discussion

The present study confirms the hypothesis that EAF treatment has an anti-diabetic effect. Given that, for the first time, this work shows that STZ-diabetic rats treated with EAF presented a significant attenuation in body weight loss as well as in the higher ingestion of food and water that features prominently in diabetes. Other studies observed that treatment with natural products improved these parameters [17, 18]. Additionally, reduction of the blood glucose levels and an improvement in several others diabetic hallmark parameters were found herein. Furthermore, anti-insulin immunohistochemical analysis shows significant increased pancreatic β -cell number and islet size in the DC group as a result of β -cell proliferation, ascertained through labelling by PCNA immunohistochemistry. In addition, our histopathological studies showed that EAF promoted reduction in the kidney tissue damage that is caused by diabetes.

A striking feature of STZ-type 1 diabetic rats is a severe reduction of body weight caused by loss of adipose and muscular tissue; these characteristics are known as cachexia [19]. Adipose and muscular tissue need insulin signalling for glucose uptake; without insulin, these tissues show a significant reduction of glucose uptake that compromises their overall metabolism [2, 17].

The main therapeutic goal of diabetes treatment is to control blood glucose levels [4, 17]. Here, we show the effectiveness of the use of *T. catigua* as a powerful anti-diabetic agent, demonstrating improvements in the hyperglycaemia, polydipsia, and polyphagia observed in STZ-diabetic rats. In light of these results, new findings are needed for better understanding the hypoglycaemic effect of *T. catigua*. On the other hand, recent studies have shown antiinflammatory and

antioxidant effects of PB2 and EPC, which exert positive effects by improving diabetes comorbidities. They were observed to bring improvement in insulin sensitivity and to exert a protective effect against diabetic nephropathy and cardiomyopathy [20, 21].

In this study, diabetic animals exhibited low blood creatinine as well as decreased total protein, albumin and globulin levels compared to control animals. Interestingly, EAF treatment restored total protein, albumin and globulin concentrations nearly to control group values. No significant effect was observed in blood creatinine in the DC group. These results are consistent with improvement of diabetes and kidney function as observed in other studies [18, 22]. Furthermore, previous studies have demonstrated lower serum creatinine levels and increased serum uric acid in STZ-diabetic animals and in type 2 diabetic humans [23]. Similarly, in this work, serum creatinine was lower and uric acid higher in the STZ-diabetic group, which could suggest renal impairments associated with diabetic complications [22]. Moreover, serum amylase was significantly elevated in STZ-diabetic rats, which is compatible with diabetic ketoacidosis [24]. However, we found that EAF attenuated diabetes-induced elevations in serum uric acid and amylase. Phenolic compounds present in *T. catigua* are probably, at least in part, the main agents responsible for the protective effect of EAF on kidney function as indicated by our results. In addition, previous studies have demonstrated that natural products exert protective effects on kidney function by mediating many of those parameters [18, 22, 25].

The increases in the activity levels of serum ALP, ALT and AST enzymes have been associated with liver damage [26]. In the present study, a significant rise in the ALP, ALT, AST and GGT serum levels was observed in STZ-induced diabetic rats, whereas the diabetic group treated with EAF showed a

significant improvement in these parameters. Several studies have shown that natural products from plants exert beneficial effects by reducing the high levels of ALP, ALT and AST in diabetic individuals, which leads an improvement in hepatic dysfunction [22, 26-28].

STZ-induced type 1 diabetes has been described as a useful experimental model for the study of diabetes because of the selective pancreatic β -cell destruction caused by this drug [29]. Here, we show a significant reduction in the number, area, and insulin immunodensity of pancreatic islets in STZ-diabetic rats that is compatible with pancreatic β -cell death caused by STZ. In particular, STZ induces the accumulation of superoxide, hydroxyl radicals and nitric oxide, which are known to be cytotoxic. Increased ROS production by STZ cause pore formation in mitochondria, resulting in disruption of the electrical potential of mitochondrial membrane, unbalancing pancreatic β -cell metabolism and insulin release [30, 31].

Interestingly, our hypothesis that EAF has anti-diabetic effects was confirmed by the findings shown in this study. Here, we depict the effectiveness of EAF treatment against diabetic complications; also, we suggest that the effects of EAF treatment in ameliorating diabetic injuries in STZ-diabetic rats may be closely associated with the increase of pancreatic β -cell proliferation as observed here, which partially restores the normal morphology and endocrine function of the damaged pancreatic islets caused by STZ in the rats. These findings indicate that EAF may be useful as a potential pharmacological agent to protect against pancreatic β -cell damage caused by oxidative stress associated with diabetes. However, the protective mechanism of EAF on pancreatic islets remains to be further clarified. We hypothesized that EAF has potentially beneficial effects against

pancreatic β -cell apoptosis that may derive from its anti-inflammatory capacity and inhibitory actions against free radicals [13].

During the course of diabetes, hyperglycaemia induces AGE formation, pro-inflammatory cytokine overexpression and oxidative stress, promoting kidney damage [27, 32]. In the present study, STZ-diabetic rats show a large area stained by Azan trichrome, indicating ECM expansion and collagen deposition. This parameter is compatible with renal fibrosis. Thus, these results were compatible with the kidney function parameters such as low creatinine and serum protein and high uric acid found in this work. On the other hand, EAF treatment inhibited ECM expansion and restored renal morphology in the DC group to a normal pattern. Obviously, EAF treatment may have improved morphology and renal function due to reduction of blood glucose. However, beneficial effects on renal function promoted by plant compound treatment, likely because of beneficial effects of polyphenols on free radicals and inflammatory status, have been observed [18, 25]. The present study showed that EAF from *T. catigua* improves glucose homeostasis and endocrine pancreas function and inhibits the development of diabetic nephropathy in STZ-induced type 1 diabetic rats. All together, these observations suggest that *T. catigua* could be useful as an anti-diabetic agent.

Fundings

This work was funded by the Brazilian Foundation: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), Paraná Science Foundation (Fundação Araucária).

Acknowledgment

All authors are grateful to Maria Euride Carlos Cancino, Maria dos Anjos Moreira Fortunato and Maria Ângela Moreira da Costa for technical assistance.

Disclosure Statement

The authors have no competing interests.

References

- ADA, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90.
- Bonassoli, V.T., Chassot, J.M., Longhini, R., Milani, H., Mello, J.C.P., de Oliveira, R.M.W., 2012. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice. *J Ethnopharmacol* 143, 179-184.
- Brownlee, M., 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625.
- Chassot, J.M., Longhini, R., Gazarini, L., Mello, J.C., de Oliveira, R.M., 2011. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J Ethnopharmacol* 137, 1143-1148.
- Cremonini, E., Bettaieb, A., Haj, F.G., Fraga, C.G., Oteiza, P.I., 2016. (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Archives of biochemistry and biophysics* 599, 13-21.
- Deeds, M.C., Anderson, J.M., Armstrong, A.S., Gastineau, D.A., Hiddinga, H.J., Jahangir, A., Eberhardt, N.L., Kudva, Y.C., 2011. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim* 45, 131-140.
- Dos Santos, A.H., Ramos, A.C., Silveira, K.M., Kiss, A.C., Longhini, R., Diniz, A., de Mello, J.C., Gerardin, D.C., 2015. The exposure to *Trichilia catigua* (catuaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. *J Ethnopharmacol* 166, 86-91.
- Guo, C., Zhang, C., Li, L., Wang, Z., Xiao, W., Yang, Z., 2014. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of oxymatrine in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 21, 807-814.
- Hjelmesaeth, J., Roislien, J., Nordstrand, N., Hofso, D., Hager, H., Hartmann, A., 2010. Low serum creatinine is associated with type 2 diabetes in morbidly obese women and men: a cross-sectional study. *BMC endocrine disorders* 10, 6.
- Honore, S.M., Cabrera, W.M., Genta, S.B., Sanchez, S.S., 2012. Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 50, 1704-1715.
- Huang, D., Jiang, Y., Chen, W., Yao, F., Huang, G., Sun, L., 2015. Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *J Ethnopharmacol* 163, 256-263.
- I.D.F., 2015. *IDF Diabetes Atlas*, 7th ed. International Diabetes Federation, Brussels, Belgium.
- Ibrahim, M.A., Islam, M.S., 2014. Anti-diabetic effects of the acetone fraction of *Senna singueana* stem bark in a type 2 diabetes rat model. *J Ethnopharmacol* 153, 392-399.

- Kamdem, J.P., Waczuk, E.P., Kade, I.J., Wagner, C., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Souza, D.O., Rocha, J.B., 2012. Catuaba (*Trichilia catigua*) prevents against oxidative damage induced by in vitro ischemia-reperfusion in rat hippocampal slices. *Neurochemical research* 37, 2826-2835.
- Karunakaran, U., Park, S.J., Jun do, Y., Sim, T., Park, K.G., Kim, M.O., Lee, I.K., 2015. Non-receptor tyrosine kinase inhibitors enhances beta-cell survival by suppressing the PKCdelta signal transduction pathway in streptozotocin-induced beta-cell apoptosis. *Cellular signalling* 27, 1066-1074.
- Longhini, R., Klein, T., Bruschi, M.L., da Silva, W.V., Jr., Rodrigues, J., Lopes, N.P., de Mello, J.C., 2013. Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of separation science* 36, 1247-1254.
- Lonni, A.A., Longhini, R., Lopes, G.C., de Mello, J.C., Scarminio, I.S., 2012. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal Chim Acta* 719, 57-60.
- Murali, R., Srinivasan, S., Ashokkumar, N., 2013. Antihyperglycemic effect of fraxetin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 95, 1848-1854.
- Raza, H., Prabu, S.K., John, A., Avadhani, N.G., 2011. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *International journal of molecular sciences* 12, 3133-3147.
- Resende, F.O., Rodrigues, E., Luftmann, H., Petereit, F., de Mello, J.C.P., 2011. Phenylpropanoid Substituted Flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their In Vitro Antioxidative Activity. *J Brazil Chem Soc* 22, 2087-2093.
- Soto, C., Raya, L., Juarez, J., Perez, J., Gonzalez, I., 2014. Effect of Silymarin in Pdx-1 expression and the proliferation of pancreatic beta-cells in a pancreatectomy model. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 21, 233-239.
- Szkudelski, T., Szkudelska, K., 2015. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* 1852, 1145-1154.
- Wada, J., Makino, H., 2013. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 124, 139-152.
- Yin, W., Li, B., Li, X., Yu, F., Cai, Q., Zhang, Z., Cheng, M., Gao, H., 2015. Anti-inflammatory effects of grape seed procyanidin B2 on a diabetic pancreas. *Food & function* 6, 3065-3071.
- Yin, X.X., Zhang, Y.D., Shen, J.P., Wu, H.W., Zhu, X., Li, L.M., Qiu, J., Jiang, S.J., Zheng, X.G., 2005. Protective effects of bendazac lysine on early experimental diabetic nephropathy in rats. *Acta pharmacologica Sinica* 26, 721-728.
- Zhang, H., Zhao, T., Gong, Y., Dong, X., Zhang, W., Sun, S., Wang, H., Gu, Y., Lu, X., Yan, M., Li, P., 2014. Attenuation of diabetic nephropathy by Chaihuang-Yishen granule through anti-inflammatory mechanism in streptozotocin-induced rat model of diabetics. *J Ethnopharmacol* 151, 556-564.

Captions of figures

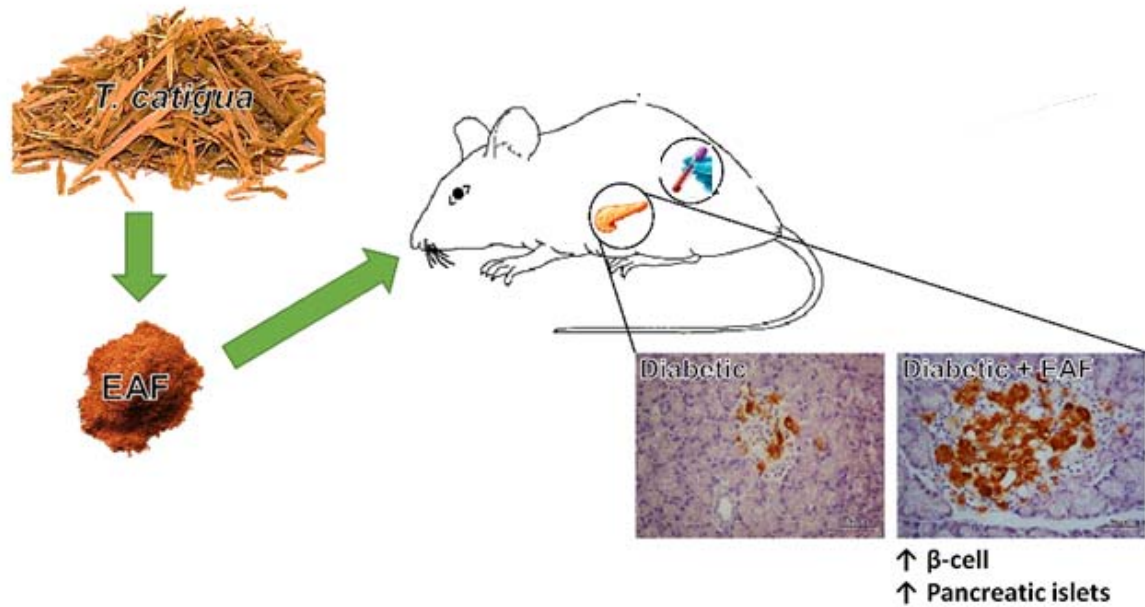


Fig. Graphical Abstract

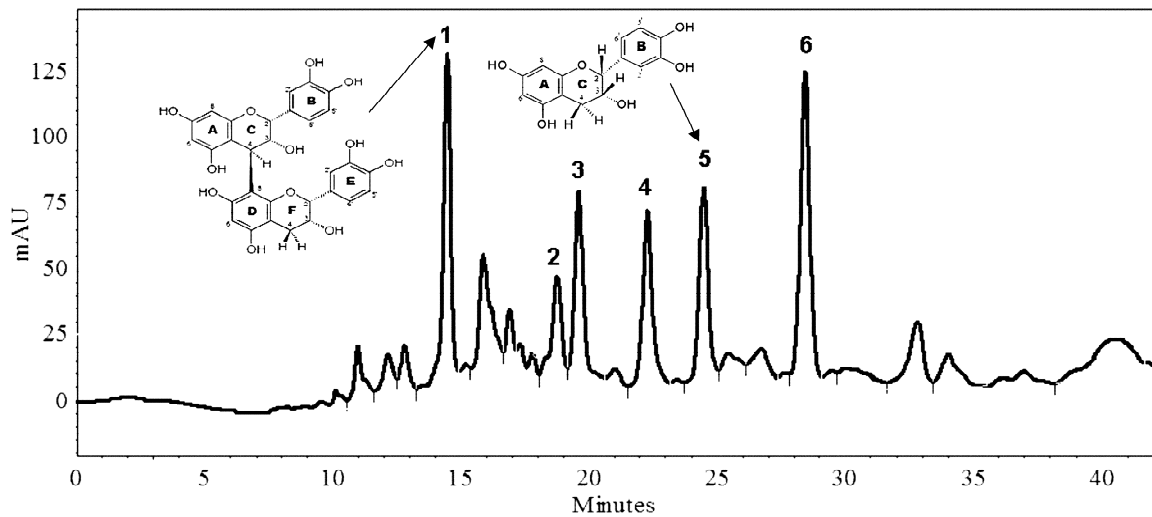


Fig. 1. HPLC analyses of EAF from *T. catigua*. Procyanidin B2 (PB2; 1), mixture of catechin and chlorogenic acid (2), cinchonain IIb (3), cinchonain IIa (4), epicatechin (EPC; 5), mixture of chinchonains Ia and Ib (6). Flow rate 0.4 mL/min and detection wavelength 280 nm.

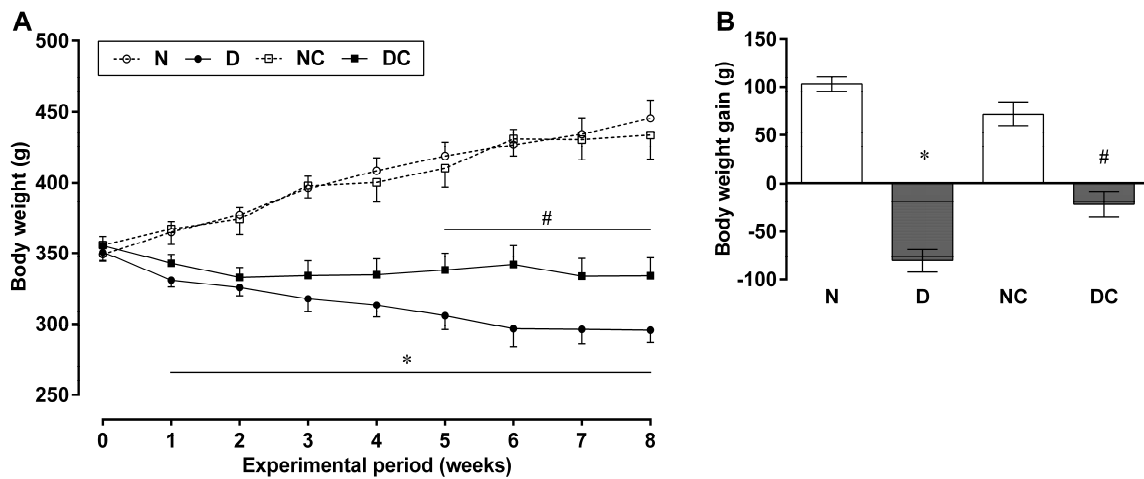


Fig. 2. Effect of EAF from *T. catigua* on body weight gain. Body weight throughout experimental period (A) and body weight gain (B). Data are presented as mean \pm SEM. *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$) and #values differ from diabetic group ($p < 0.05$). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

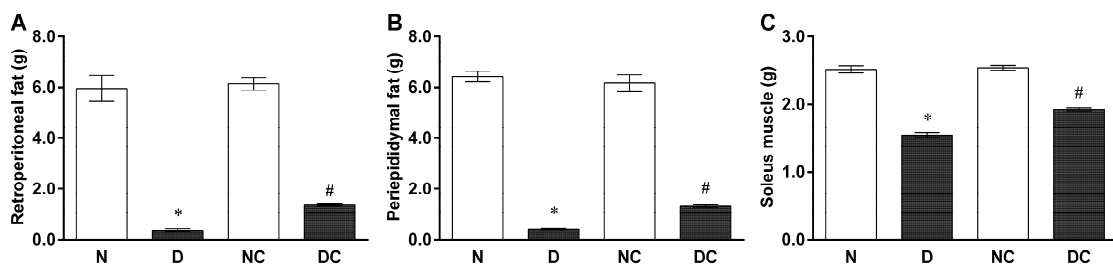


Fig. 3. Effect of EAF from *T. catigua* on adipose tissue and soleus muscle. Retroperitoneal adipose tissue (A), periepididymal adipose tissue (B) and soleus muscle (C) weight. Data are presented as mean \pm SEM. *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$) and #values differ from diabetic group ($p < 0.05$). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

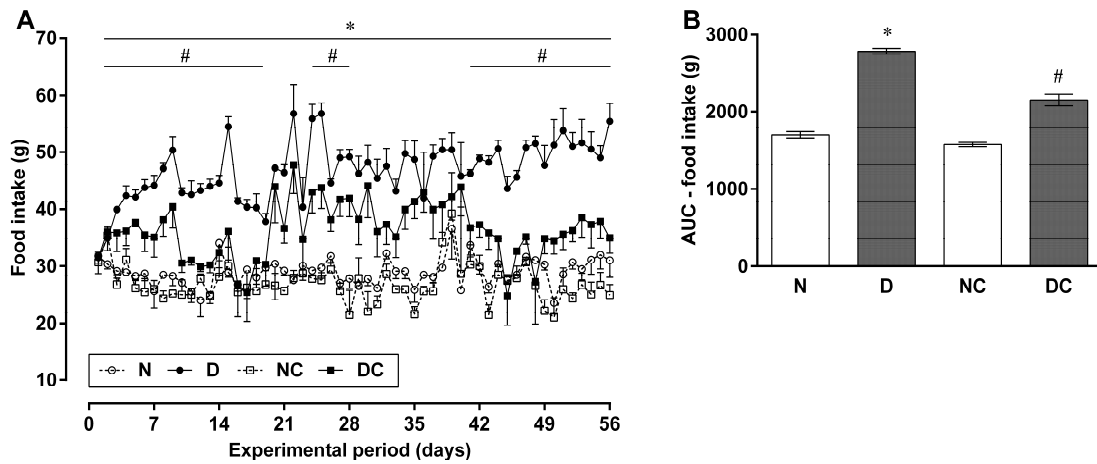


Fig. 4. Effect of EAF from *T. catigua* on food intake. Food intake throughout experimental period (A) and AUC of food intake (B). Data are presented as mean \pm SEM. *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$) and #values differ from diabetic group ($p < 0.05$). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

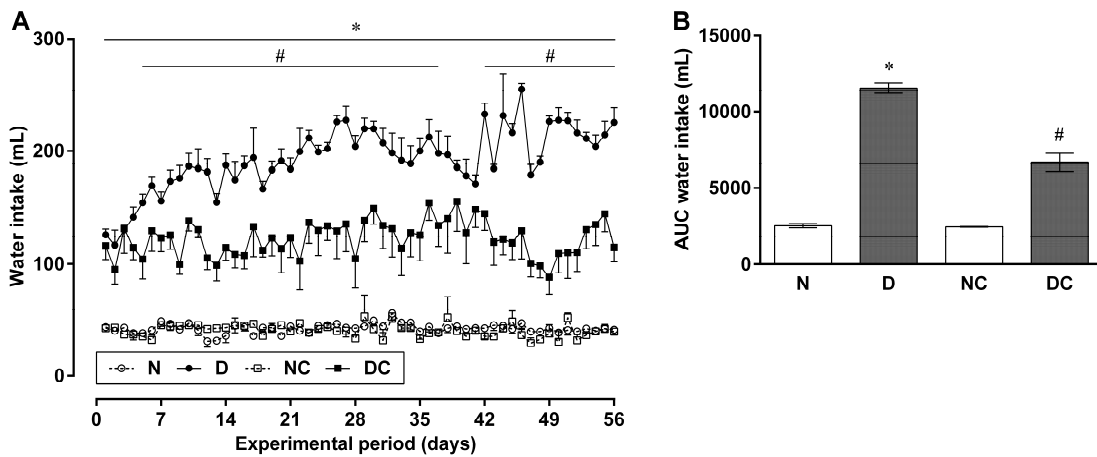


Fig. 5. Effect of EAF from *T. catigua* on water intake. Water intake throughout experimental period (A) and AUC of water intake (B). Data are presented as mean \pm SEM. *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$) and #values differ from diabetic group ($p < 0.05$). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

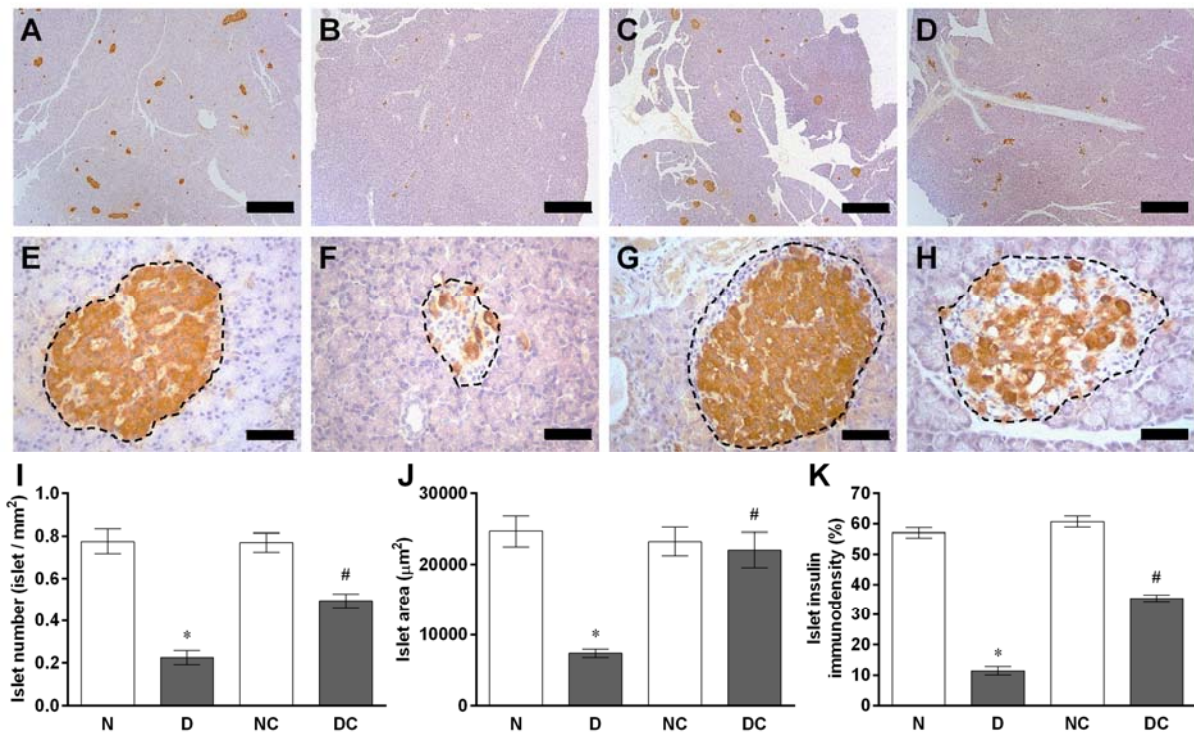


Fig. 6. Effect of EAF from *T. catigua* on morphology of endocrine pancreas. Representative photomicrography (A – D, ×20 magnification, scale bars = 1000 μm and E – H, ×400 magnification, scale bars = 50 μm) showed pancreatic sections immunostained with anti-insulin antibody. Non-diabetic group (A and E), diabetic group (B and F), non-diabetic + EAF group (C and G) and diabetic + EAF group (D and H). Quantitative analysis is showedn in (I), (J) and (K). Data are presented as mean ± SEM, *values differ from non-diabetic group (p<0.05) and #values differ from diabetic group (p<0.05). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

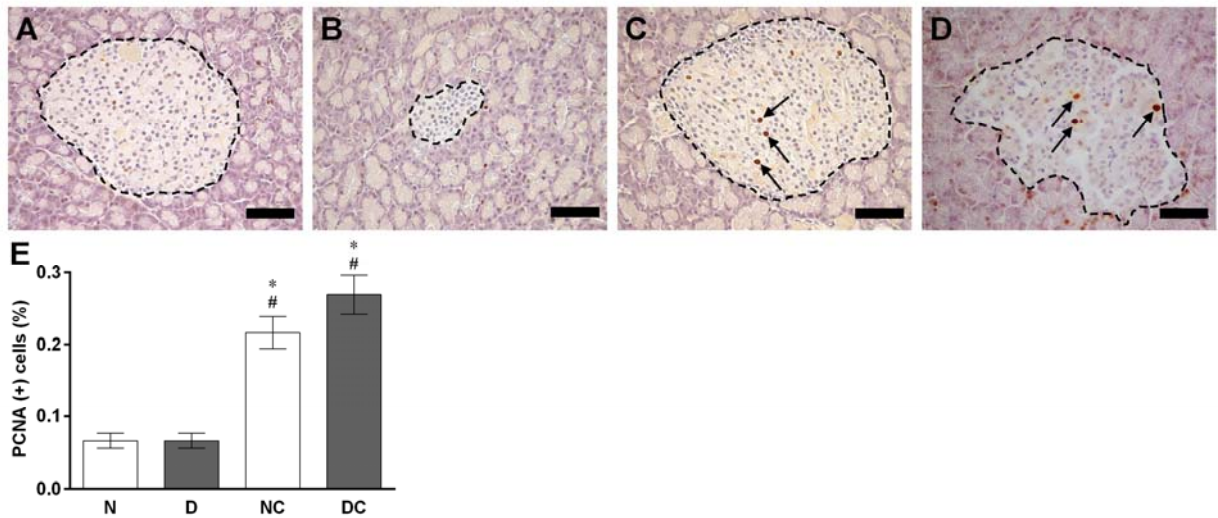


Fig. 7. Effect of EAF from *T. catigua* on cellular proliferation of endocrine pancreas. Representative photomicrography (A – D, $\times 400$ magnification, scale bars = 50 μm) showed pancreatic sections immunostained with anti-PCNA antibody. Non-diabetic group (A), diabetic group (B), non-diabetic + EAF group (C) and diabetic + EAF group (D). Images showed nuclei immunolabelled for PCNA in the pancreatic islets from *T. catigua* treated groups (arrows). Quantitative analysis of the PCNA-positive cells (E). Data are presented as mean \pm SEM, *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$) and #values differ from diabetic group ($p < 0.05$). One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

Tables

Table 1. Effect of EAF from *T. catigua* on biochemical analysis.

	N	D	NC	DC
Blood glucose (mg/dL)	109.0±1.24	547.9±13.21*	105.3±5.33	414.6±34.87 [#]
Total protein (g/dL)	5.71±0.05	4.61±0.05*	5.76±0.10	5.17±0.06 [#]
Albumin (g/dL)	2.81±0.03	2.45±0.03*	2.80±0.11	2.76±0.08 [#]
Globulin (g/dL)	2.91±0.03	2.10±0.04*	2.93±0.04	2.40±0.04 [#]
Amylase (U/dL)	916.0±21.58	1753.6±55.22*	931.4±16.40	1312.1±24.72 [#]
ALP (U/L)	138.6±7.69	1078.3±15.86*	152.7±7.95	759.4±26.23 [#]
ALT (U/L)	224.7±22.47	658.3±65.85*	222.1±25.87	419.1±67.10 [#]
AST (U/L)	494.0±44.83	693.6±22.73*	366.4±61.96	335.9±15.60 [#]
GGT (U/L)	11.57±1.0	44.00±4.6*	12.29±1.5	18.71±4.5 [#]

Data are presented as means ± SEM. *values differ from non-diabetic group ($p < 0.05$), [#]values differ from diabetic group ($p < 0.05$) and ns, no significantly different. One-way ANOVA and post hoc test of Tukey.

ARTIGO 2

O presente artigo foi concebido e elaborado conforme as regras do periódico:

The Journal of Nutritional Biochemistry

Classificação do Periódico na Avaliação de Periódicos Qualis da CAPES:

A1

Fator de impacto:

4,668

Fração acetato de etila de *Trichilia catigua* protege animais das complicações decorrentes da nefropatia diabética

Luis Fernando de Paulo^{a*}; Jacqueline Nelisis Zanoni^b; Rodrigo Mello Gomes^c; Muriel Fernanda de Lima^d; Juliana Vanessa Colombo Martins Perles^a; Bruna Colombo Cordeiro^c; Cynthia Priscilla do Nascimento Bonato Panizzon^b, João Carlos Palazzo de Mello^e, Marcello Fabiano de Franco^f, Rodrigo Cabral Luiz^a; Rubens Cecchini^a, Poliana Marinello^a; Flávia Alessandra Guarnier^a; Eduardo José de Almeida Araújo^g; Camila Quaglio Neves^c; Renata Longhini^e; and Alessandra Lourenço Cecchini^{a*}.

^aDepartment of General Pathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^bDepartment of Morphological Sciences, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

^cDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

^dDepartment of Nursing, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil

^eLaboratory of Pharmaceutical Biology, Palafito, Maringá, Brazil

^fDepartment of Pathology, Paulista School of Medicine – EPM, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^gDepartment of Histology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

**Corresponding author.*

Luis Fernando de Paulo; Travessa Marfim, 25 – Jardim Vitória – 87023-710 – Maringá - PR

E-mail address: luisfernandodepaulo@gmail.com

RESUMO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica de distribuição mundial, e caracteriza-se pela deficiência total ou parcial da insulina, podendo resultar em doenças secundárias como a nefropatia, caracterizada por alterações histopatológicas renais. A Catuaba (*Trichilia catigua*) tem sido utilizada no tratamento de diversas doenças como agente antioxidante ou anti-inflamatório. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a Fração de Acetato de Etila de *Trichilia catigua* (EAF) possui efeito protetor sobre as complicações renais decorrentes do DM. Para isso, utilizou-se ratos Wistar divididos em 4 grupos: normoglicêmico, normoglicêmico tratado com EAF (200 mg/kg); diabéticos e diabéticos tratados com EAF. O diabetes foi induzido por estreptozotocina (STZ) (35 mg/kg). Dois dias após a injeção de STZ, o EAF foi administrado por gavagem, durante 56 dias. Foram realizadas análises dos parâmetros metabólicos, bioquímicos e histológicos. Os ratos do grupo diabético apresentaram redução de peso corporal e a administração EAF no grupo diabético tratou a perda de massa corporal. O tratamento com EAF levou a redução da glicemia nos animais tratados e melhorando também parâmetros bioquímicos relacionados a função renal. Além disso, estudos histopatológicos do rim mostraram que o EAF promove redução da glomerulosclerose, degeneração glicogênica e depósito de colágeno. Salienta-se ainda que as dosagens relativas ao estresse oxidativo apresentaram uma capacidade do EAF prevenir a peroxidação lipídica em animais diabéticos tratados. Nosso estudo demonstrou que extrato de *T. catigua* melhora a homeostase da glicose e previne a formação de espécies reativas de oxigênio, inibindo o desenvolvimento da nefropatia diabética.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Lesão Renal; Proteção; Catuaba; *Trichilia catigua*. Estresse oxidativo.

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica de distribuição mundial, que atinge cerca de 10% da população mundial e caracteriza-se pela deficiência ou mesmo não produção de insulina pelas células β pancreáticas. Essa deficiência apresenta como principal resultado a hiperglicemia crônica, que por sua vez produz alterações metabólicas e sistêmicas[1-4].

O diabetes é classificado em 4 tipos básicos: o DM Tipo 1, DM Tipo 2, Diabetes Gestacional e outros tipos de DM. Dentre as principais complicações do DM temos alterações bruscas nos níveis da glicose (hiperglicemia e hipoglicemia) e o desenvolvimento de doenças secundárias ao estado diabético, como a retinopatia, complicações cardiovasculares, neuropatia e nefropatia [5-8].

O DM tem capacidade de comprometer o tecido renal, através de alterações inflamatórias, degenerativas e também nos sistemas de microcirculação. Essas alterações são diagnosticadas como Nefropatia Diabética, evoluindo para doença crônica que acompanhada de alterações no sistema vascular contribuem de maneira significativa para o aumento da mortalidade de pacientes diabéticos [9]. É verdadeira a afirmação de que os índices de mortalidade e de comprometimento dos pacientes são diminuídos, com o controle glicêmico e da pressão arterial, uma vez que a presença de níveis alterados de glicose causam o aumento de produtos da glicação avançada lesando as células endoteliais de capilares renais, em associação com níveis alterados de pressão arterial que lesam os capilares glomerulares por processo mecânico, contribuindo para lesões que culminam na esclerose glomerular [10].

A nefropatia diabética caracteriza-se por alterações degenerativas no tecido renal, com lesões dos glomérulos e túbulos distais muitas vezes por mecanismos de estresse oxidativo, e que, juntamente com lesões pancreáticas criam um ambiente favorável para o desenvolvimento das complicações do DM [11,12].

Dentre as complicações renais do DM, tem-se a glomeruloesclerose que histologicamente apresenta-se pela deposição do mesângio renal, pelo aumento de matriz mesangial e também de células mesangiais, que caracterizam a expansão mesangial – que ocorre devido a lesão dos produtos da glicação avançada contra as células mesangiais, contribuindo assim para a diminuição da capacidade de filtração do glomérulo acometido. Outra característica histológica importante é a deposição de moléculas de glicogênio nas células tumefeitas dos túbulos distais que reabsorvem a glicose presente em grande quantidade no ultrafiltrado urinário. Esta alteração histológica recebe o nome de degeneração ou degeneração glicogênica [10,11,12].

A utilização de compostos naturais no tratamento de doenças crônicas tem sido bastante estudado. A Catuaba (*Trichilia catigua*) é popularmente utilizada no tratamento de estresse, impotência, déficit de memória e fadigas [13].

Considerado que o DM como doença crônica causa um ambiente inflamatório sistêmico, e sabendo de evidências em estudos recentes com a fração de acetato de etila (EAF) de Catuaba, tem mostrado resultados promissores apresentando efeitos anti-inflamatórios [14,15], efeitos anti-oxidantes [16] e antidepressivos [15], o objetivo deste trabalho foi avaliar se a Fração de Acetato de Etila de *Trichilia catigua* (EAF) possui efeito protetor contra as complicações renais decorrentes do DM, analisando-se parâmetros bioquímicos, morfologia tecidual e

alterações histopatológicas, e parâmetros do estresse oxidativo nos rins de animais diabéticos e diabéticos que receberam EAF.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Modelo Experimental

Para a realização dos experimentos, vinte e quatro ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 90 dias de idade foram utilizados, pesando entre 330 e 370g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (protocolo N.º 066/2012 e declaração de autorização N.º 082/2012). Durante o protocolo experimental, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá, em ambiente com temperatura controlada (20°C a 25°C), ciclo claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e alimentação, em grupos de 3 animais por caixa (de dimensões 50x60x22cm). Os animais foram alimentados com ração industrial padrão (Nuvilab[®], Colombo, Paraná, Brazil) para ratos e água *ad libitum*. Após uma semana de adaptação, os animais foram divididos em quatro grupos (n = 6 animais / grupo): (N) do grupo normoglicêmicos, (D) o grupo diabéticos, (N-EAF) normoglicêmicos tratados com EAF e (D-EAF) diabéticos tratados com EAF.

2.2. Droga vegetal e Preparação do EAF

As cascas do vegetal *T. catigua* A. Juss. foram doadas pelo Laboratório Catarinense, Joinville, SC, em julho de 2008. A coleta do material botânico foi realizada na cidade de Caitité, no estado da Bahia, Brasil. A exsicata se encontra depositada no herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba sob o número 65901. As cascas foram fragmentadas, e as cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. A extração foi realizada por Ultra-turrax UTC 115 KT, utilizando acetona/água (7:3; v/v)

como líquido extrator, na proporção de 10% (m/v). Após evaporação do solvente sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto (EB) de *T. catigua* segundo Resende (2007) [17]. O EB de *T. catigua* foi avaliado quanto ao teor de polifenóis totais, segundo a Farmacopeia Brasileira (2004), para garantir a sua padronização. Cerca de 50 g de EB foi ressuspenso em água (0,5 L) e particionado com acetato de etila, obtendo, assim, a fração acetato de etila (EAF). A EAF foi avaliada quanto ao seu teor de princípios ativos utilizando metodologia validada por Longhini *et al.* (2013) [18], através da cromatografia líquida de alta eficiência em auxílio de tesouras de poda manual e secas a temperatura ambiente. A qualidade da EAF obtida foi validada a partir da presença de procianidina B2 e epicatequina presentes na fração, de acordo com metodologia descrita por Longhini *et al.* (2013) [18]. Esses experimentos foram realizados no Laboratório Palafito, de Farmagnosia da Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof Dr. João Carlos Pallazzo de Mello.

2.3. Indução do Diabetes

Os ratos dos grupos D e D-EAF foram submetidos a indução do Diabetes mellitus após 14 h de jejum. A indução foi realizada através de uma injeção intravenosa em veia peniana de estreptozotocina (35 mg / kg de peso corporal; Sigma, St. Louis, MO, EUA) dissolvida em solução tampão de citrato, pH 4,5 (10 mM). Para verificar se houve a indução eficaz do diabetes, após dois dias, uma gota de sangue foi obtida para determinação da glicemia através de método fotométrico por meio da avaliação de glicose oxidoreductase (Accu-Chek glicosímetro Ativo, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, BW, Alemanha). Os ratos

que apresentaram níveis de glicose acima de 250mg/dL foram considerados animais diabéticos¹⁹.

2.4. Tratamento com EAF

Os animais dos grupos N-EAF e D-EAF foram tratados diariamente com dose individual de EAF administrado por gavagem gástrica 200 mg/Kg, 7 dias por semana, durante 8 semanas. Para a diluição do EAF foi necessária a padronização de uma solução veículo que permitisse a diluição do EAF em solução salina 0,9%. Essa solução veículo foi formada por solução salina 0,9% + glicerina, na proporção de 1 gota de glicerina para cada 10 mL de solução salina. Dessa maneira, foi possível a dissolução do EAF na solução veículo e a administração por gavagem aos animais dos grupos tratados. Os animais dos grupos não tratados receberam apenas solução veículo sem o EAF.

2.5. Avaliação do Peso Corporal

O peso corporal foi acompanhado semanalmente a partir do início do estudo até o último dia, com uso de balança comercial Digimed (KN1000) para pequenos animais.

2.6. Coleta das Amostras

Ao final do tratamento com EAF, os animais foram submetidos a eutanásia, sem dor ou sofrimento, com tiopental sódico (ip de 40 mg / kg de peso corporal), para coletar os rins, que foram em plano coronal para se conseguir duas

amostras iguais, uma para análise histológica e outra para análise posteriores e o sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca para posterior análise bioquímica.

2.7. Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas foram coletados 4 mL de sangue por punção cardíaca em tubo sem anticoagulantes que foram centrifugados após retração dos coágulos e 2 mL em tubo com anticoagulante fluoreto de sódio. As análises foram realizadas em analisador de bioquímica Vitros FS 5.1 (Johnson & Johnson) através do método de química seca conforme instruções do fabricante, tendo como amostra, plasma fluoretado para análise da glicemia (GLI), e soro centrifugado para análises Ureia (URE), Creatinina (CRE), Proteínas Totais e Frações (Albumina e Globulina) e Amilase.

2.8. Histologia Renal

As amostras coletadas para o análise histológicas foram fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (V:V), durante 48 horas, e posteriormente colocados em álcool 70%, até o momento do processamento histológico. O processamento se deu em Processador de Tecidos (Lupetec Mod. PT05), submetendo o material acondicionado em cassetes individuais, a 6 banhos de álcool (70%, 80%, 90%, 100%, 100% e 100%) para a desidratação do material, 4 banhos de xilol (solvente orgânico, Synth) buscando a diafanização e 2 banhos de parafina histológica (Biotec® Pinhais, Paraná, Brasil) para impregnação dos tecidos. Posteriormente os espécimes foram incluídos com novo banho de parafina

histológica em central de inclusão. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos a microtomia em micrótomo Leica RM2245 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), em cortes semi-seriados de 5mm, coletados de maneira sequencial, porém distribuídos em 10 lâminas de vidro tratadas com adesivo químico (OrganoSilano) depositados 1 corte por lâmina, de forma que a distribuição dos cortes em uma única lâmina fiquem semi-seriados, obtendo-se assim 50 cortes de cada bloco para as diferentes colorações, que foram submetidas a desparinização em estufa a 56-70°C.

Antes de cada coloração, as lâminas selecionadas recebem tratamento de diafanização em 3 banhos de xilol para retirada do excesso de parafina, e início do processo de hidratação com banhos sucessivos de álcool em escala decrescente (100%, 100%, 100%, 90%, 80% e 70%) para os procedimentos de coloração histoquímicas específicas, sendo que após cada processo de coloração as lâminas já coradas são desidratadas em banhos sucessivos em escala crescente de álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100% e 100% e diafanização em xilol, para montagem das mesmas com lamínula e resina sintética Permount.

2.8.1. Colorações Histológicas

2.8.1.1. Hematoxilina-Eosina (HE)

Foi realizada coloração com HE para as avaliações da morfologia renal, incluindo descrição e análise histopatológica, contagem do número total de glomérulos além da morfometria do corpúsculo renal com a medida da Cápsula de Bowman, do Tufo Glomerular, do Espaço de Bowman (diferença entre as medidas da área da cápsula de Bowman e da área do tufo glomerular), e do Diâmetro

glomerular. Após a desparafinização foi iniciado o processo de coloração, em que as lâminas permaneceram por 1 minuto em solução de Hematoxilina de Harris, foram lavadas e diferenciadas em água corrente por 5 minutos e, em seguida, colocadas em Solução de Eosina por 3 minutos. Depois de corados, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e para montagem das mesmas com lamínula e resina sintética Permount.

2.8.1.2. Ácido Periódico de Schiff (PAS)

A coloração com PAS foi realizada para avaliação da expansão mesangial e Nefrose Glicogênica. Este corante identifica os glicosaminoglicanos presentes na matriz mesangial com uma coloração rósea mais intensa do que em outras áreas. Para o procedimento de coloração os cortes desparafinizados foram tratados com ácido periódico por 5 minutos e lavados com água corrente durante 5 minutos. Em seguida foram tratados com reagente de Schiff por 7 minutos e solução de metabissulfato de sódio em três banhos de 2 minutos. Depois de corados, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e para montagem das mesmas com lamínula e resina sintética Permount.

2.8.1.3. Picrosirius (Sirius Red)

A coloração de Picrosirius foi utilizada para a análise do depósito de colágeno no tecido renal. Após procedimentos padrões anteriores a etapa de coloração, os cortes foram então corados com Solução de Sirius Rede (Sirius Red F 3B 200® ,MobyChemicalCo., Union), na concentração de 0,1% por 30 minutos. Após a coloração os cortes foram lavados por 5 minutos em água corrente e

contracorados em Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Depois de corados, as lâminas foram desidratados, diafanizados e para montagem das mesmas com lamínula e resina sintética Permout. Tecidos corados pelo Picrosirius foram analisados em microscópio de luz polarizada, acoplado a um analisador de imagem.

2.9. Obtenção das Imagens

Os parâmetros histológicos e morfométricos foram obtidos por microscopia óptica, com auxílio do microscópio Nikon 80i (Tokio, Japão). A morfometria foi efetuada por meio da câmera digital acoplada ao microscópio Nikon 80i. A análise foi realizada com o auxílio do programa Image-Pro Plus® 4.5 (Media Cybernetics; Rockville - USA) software, calibrado em micrômetros. Utilizando-se desses equipamentos foram estabelecidos os seguintes parâmetros da histologia para o estudo: quantificação dos glomérulos, área das estruturas renais e fração da área mesangial e de colágeno. A análise da área ocupada pelo colágeno por coloração de Picrosirius, foram obtidas em microscopia de luz polarizada, sendo que o sistema utilizado consistiu de uma câmera CCD Sony (Tokio, Japão) conectada a um microscópio Olympus (Tokio, Japão), a partir do qual as imagens podiam ser visualizadas em um monitor. Por intermédio de um sistema digital inserido num computador, as imagens foram processadas por um software ImageProPlus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc.).

2.10. Análises Histológicas

2.10.1. Determinação da Área das Estruturas Renais

Para avaliação da área das estruturas renais foram escolhidos aleatoriamente e fotografados um total de 100 glomérulos por animal. Calculou-se a área do tufo glomerular por meio da captura da imagem de cada glomérulo com lente de aumento de 400 vezes, traçando-se os limites externos do tufo glomerular com o cursor do mouse. O mesmo procedimento foi utilizado para a mensuração da área da cápsula de Bowman. A área do espaço de Bowman foi calculada pela subtração da área da capsula pela área do tufo. A média dos 100 valores mensurados em cada parâmetro foi considerada como a área média para cada um dos animais. Essas medidas foram expressas em μm^2 . O diâmetro glomerular foi medido através do tracejamento da parte equatorial do glomérulo, a medida do diâmetro glomerular foi expressa em μm .

2.10.2. Determinação da Glomeruloesclerose e Expansão Mesangial

Para avaliação da expansão mesangial 100 glomérulos corados com PAS por animal foram aleatoriamente selecionados e fotografados. Para quantificação do nível de expansão mesangial e glomeruloesclerose, uma escala semiquantitativa com valores de (-) a (+++++) foi utilizada. O valor (-) foi utilizado quando não havia esclerose, o valor (+) indicava expansão mesangial ou esclerose envolvendo até 25% do glomérulo, o valor (++) indicava esclerose entre 25 a 50%, o valor (+++) indicava esclerose entre 50 a 75%, e o valor (+++++) indicava esclerose global (>75%), de acordo Freitas, 2011 [21]. A moda dos valores obtidos nos 100

glomérulos foi considerada como o índice de glomeruloesclerose e expansão mesangial para cada animal.

2.10.3. Determinação da Degeneração Glicogênica

Para avaliação da degeneração glicogênica 100 campos microscópicos corados com PAS por animal foram aleatoriamente selecionados e fotografados. Para quantificação do nível da degeneração glicogênica, uma escala semiquantitativa com valores de (-) a (+++++) foi utilizada. O valor (-) era utilizado quando não havia degeneração glicogênica, o valor (+) indicava degeneração glicogênica envolvendo até 25% do glomérulo, o valor (++) indicava necrose entre 25 a 50%, o valor (+++) indicava degeneração glicogênica entre 50 a 75%, e o valor (+++++) indicava degeneração global (>75%), de acordo Freitas, 2011 [21]. A moda dos valores obtidos nos 100 glomérulos foi considerada como o índice de degeneração glicogênica para cada animal.

2.10.4. Determinação da Área Ocupada por Colágeno

Para a determinação da área ocupada pelo colágenos no tecido renal foi realizada a coloração Picrosirius, onde as lâminas foram analisadas em microscópio de luz polarizada, acoplado a um analisador de imagem. O sistema utilizado consistiu de uma câmera CCD Sony (Tokio, Japão) conectada a um microscópio Olympus (Tokio, Japão), a partir do qual as imagens podiam ser visualizadas em um monitor. Por intermédio de um sistema digital inserido num computador, as imagens foram processadas por um software ImageProPlus 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Inc.). Foram, então, selecionados aleatoriamente 50 (cinquenta)

campos, incluindo as região de túbulos contorcidos distais e proximais e também região de glomérulos renais, visualizados sob um aumento de 100 vezes. A área total medida pelo analisador em cada campo é de 192533,33 μm^2 . A área contendo colágeno em cada campo foi medida através da seleção de tonalidades birrefringentes, vermelho-alaranjado, com posterior medida de área digitalizada. As análises foram expressas em área total ocupada pelo colágeno e também por porcentagem de área ocupada pelo colágeno no tecido renal.

2.11. Análises do Estresse Oxidativo

2.10.1. Medida da Peroxidação Lipídica por Quimioluminescência Iniciada com Hidroperóxido de Terc-butil

O experimento foi realizado como descrito por Gonzalez-Flecha et al (1991) [22] usando um homogenato de rim total de 10 mg / mL em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Até o momento da análise, os tubos foram mantidos no escuro, e a ação foi avaliada em um luminômetro TD / 20 20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA), com um intervalo de resposta de 300-650 nm. Para cada rato, uma captura cinética de quimioluminescência foi realizada durante 40 min. A curva final foi determinada por ajuste gaussiano, e as curvas de quimioluminescência foram calculadas para determinar os hidroperóxidos lipídicos presentes na amostra.

2.11.2. Determinação de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

O teste TBARS foi utilizado para estimar o produto final da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), e foi executado descrito por Oliveira e Cecchini (2000) [23], utilizando o mesmo homogenato renal descrito no ensaio QL (10 mg / mL). Os níveis de TBARS foram determinados espectrofotometricamente e os níveis de MDA foram expressos em nmol / mg de tecido.

2.11.3. Proteína carbonilica

O teor de carbonila de proteína foi quantificado como descrito anteriormente por Reznick e Packer (1994) [24], com modificações descritas por Bernardes *et al* (2014) [25] num homogenato de rim (50 mg / mL) preparado em tampão de fosfato 50 mM, pH 7,4, centrifugado a 820 g a 4 ° C durante 15 min. A fórmula utilizada para calcular o teor de carbonilo foi: $C = Abs (355-390 \text{ nm}) \times 4545$ nmol / mL, em que 45,45 é o coeficiente de absorção. Os resultados foram expressos em nmol por mg de proteína total. O teor de proteína total foi determinado com base no método de Lowry *et al* (1951) [26], modificado por Miller (1959) [27].

2.12. Análise Estatística

Os dados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (SEM). Após análise da distribuição de normalidade, através do teste de Kolmogorv-Smirnov, com todos os dados apresentando distribuição normal, os valores foram submetidos a análise de variância one-way (ANOVA) com o post teste de Tukey,

apresentando diferenças significativas entre os valores médios dos diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Análise estatística e os gráficos confecção foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism Versão 6.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1. Parâmetros Fisiológicos e Bioquímicos

O peso inicial em todos os grupos foi similar ($p > 0,05$). Nos animais diabéticos (D) houve uma redução do peso final ($p < 0,001$) e ganho de peso ($p < 0,001$) (Tabela 1). A administração da *T. catigua* nos animais diabéticos (D-EAF) evitou a perda de massa corporal e melhorou o ganho de peso sendo similares ao controle (N) ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Os animais do grupo D e D-EAF estavam hiperglicêmicos ($p < 0,05$), entretanto foi observado uma redução dos níveis glicêmicos dos animais D-EAF ($p < 0,01$; Tabela 1) em comparação ao grupo D.

Não foi observado alterações na massa corporal final, ganho de peso e glicose quando os grupos N e N-EAF foram comparados ($p > 0,05$; Tabela1).

No grupo D em relação ao grupo N foi constatada um aumento na concentração de ureia ($p < 0,001$; Figura 1b) em 42%, e também da amilase ($p < 0,001$; Figura 1f) em 48%. Por outro lado, as proteínas totais ($p < 0,001$; Figura 1c), albumina ($p < 0,05$; Figura 1d) e globulina ($p < 0,05$; Figura 1e) sofreram uma redução de 19%, 12% e 25% respectivamente.

A administração de *T. catigua* nos animais diabéticos apresentou uma redução na concentração de ureia em 18% (D-EAF x D; $p < 0,01$; Figura 1b) e também na concentração de amilase em 25% (D-EAF x D; $p < 0,001$; Figura 1f). Enquanto houve o aumento da concentração de proteínas totais em 10% (D-EAF x D; $p < 0,001$; Figura 1c).

A creatinina, ureia, proteínas totais, albumina, globulina e amilase foram similares entre os grupos N-EAF e N ($p > 0,05$; Figura 1).

3.2. Análise Morfométrica e Histopatológica

A análise dos dados morfométricos do glomérulo demonstram que os animais do grupo D apresentaram um aumento na área do tufo glomerular (Figura 2b) e no diâmetro glomerular (Figura 2d) de 21% e 13% (D x N; $p < 0,001$), respectivamente. Também foi observado uma diminuição na área do espaço urinário (D x N; $p < 0,01$; Figura 2c) de 21%. Por outro lado, os animais D-EAF apresentaram aumento na área do glomérulo ($p < 0,01$; Figura 2a) de 12% e um aumento de no espaço urinário de 25% (D-EAF x D; $p < 0,01$; Figura 2c).

Não foram encontradas alterações na morfometria do glomérulo nos animais dos grupos N-EAF quando comparados ao grupo N ($p > 0,05$; Figura 2).

As análises histopatológicas dos rins possibilitaram a determinação de alterações estruturais da morfologia renal. Os grupos normoglicêmicos (N e N-EAF) não apresentaram alterações histológicas significativas mantendo a disposição dos capilares glomerulares compatíveis com a normalidade (Figuras 3b e 3d), bem como o depósito de matriz mesangial (Figuras 3c e 3e). Nos animais diabéticos (grupo D) foi observado a presença de esclerose glomerular acentuada no grupo diabético, com a presença de fibrose glomerular, hialinose mesangial, hialinose arteriolar, aderência do tufo glomerular a cápsula de Bowman, hipertrofia tubular, perda da borda em escova e degeneração tubular glicogênica (vesículas basofílicas) (Figuras 3f). Algumas dessas alterações foram confirmadas pela coloração por PAS, sendo evidenciado espessamento do mesângio glomerular, vesículas coradas pelo púrpura no interior das células tubulares bem como espessamento da membrana basal tubular (Figura 3g).

Por outro lado, os animais diabéticos que receberam *T. catigua* (D-EAF) apresentaram glomeruloesclerose moderada e fibrose glomerular menos intensa, ausência de aderência do tufo glomerular a cápsula de Bowman, menor hipertrofia tubular e preservação da borda em escova das células tubulares (Figuras 3h). Através da técnica de PAS foi possível verificar um menor depósito de mesângio no glomérulo e membrana basal menos evidente (Figura 3i) e presença de vesículas intracelulares basofílicas em menor número no interior das células tubulares (Figura 4a e 4b).

A análise da deposição do colágeno nos rins apresentou como resultado um aumento de cerca de 42% nos animais do grupo D (D x N; $p < 0,05$; Figura 5a, 5b1 e 5b3). A *T. catigua* apresentou capacidade de diminuir a deposição do colágeno em 58% nos animais diabéticos que receberam EAF (D-EAF x D; $p < 0,05$; Figura 5a, 5b3 e 5b4).

3.3. Análise do Estresse Oxidativo

As análises dos parâmetros do estresse oxidativo apresentam um aumento nos valores da peroxidação lipídica inicial, realizados pelo método de quimioluminescência (Figura 6A), dos animais diabéticos (D) comparados com grupo normoglicêmicos (N) ($p < 0,05$). Não foi constatada diferença do grupo D-EAF comparado ao grupo D ($p > 0,05$). Os resultados entre o grupo N e N-EAF foram semelhantes ($p > 0,05$).

O resultado descrito apresenta concordância com os dados de área sob a curva (AUC) da quimioluminescência apresentados na Figura 6B.

Quando analisamos o produto final de peroxidação lipídica (Figura 6C) encontramos mais uma vez concordância entre os dados, uma vez que o gráfico de curvas

(Figura 6B) demonstra um pico inicial da peroxidação lipídica nos animais diabéticos (D) e diabéticos tratados (D-EAF), conforme demonstrado também na Figura 6A, e um decréscimo na dosagem nos estágios finais.

Analisando somente o produto final da peroxidação (MDA), vemos que os animais diabéticos (D), apresentaram diminuição nos níveis de peroxidação lipídica quando comparados com o grupo normoglicêmico (N) ($p < 0,05$). Salienta-se no entanto que a comparação entre grupos normoglicêmicos (N x N-EAF) e diabéticos (D x D-EAF) foram similares ($p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os dados do perfil bioquímico apresentados nesta pesquisa estão em consonância com as variáveis observadas em animais diabéticos. Os resultados da concentração de proteína total e das suas frações (albumina e globulina), e amilase confirmam a eficiência da STZ para induzir diabetes. Este composto químico pode danificar o pâncreas, aumentando desta forma o nível de amilase sérica comum em lesões pancreáticas necróticas e apoptóticas que geralmente apresentam reações inflamatórias concomitantes. A instalação do DM pode desencadear o desenvolvimento de lesões renais que diminuem a capacidade de filtração dos glomérulos renais e por consequência diminui os níveis de proteínas totais nos diabéticos [13-19].

Nos animais diabéticos foi observado um aumento na concentração de ureia. Nesta perspectiva, estudos demonstraram alterações semelhantes aos encontrados em nossos resultados, como a diminuição da depuração de uréia pelos rins devido a lesões renais, com consequente aumento dos níveis séricos dessa substância [28-35]. Além disso, os valores de creatinina observados decaíram possivelmente em consequência da perda de peso muscular e incapacidade da metabolização do carboidrato em pacientes com diabetes [19,32-35].

Nesta pesquisa foi identificado o aumento do mesângio renal, áreas de fibrose, diâmetro glomerular aumentado e sinais de glomerulosclerose nos animais diabéticos em comparação com os animais normoglicêmicos. Estas adaptações morfológica ocorrem principalmente devido à deposição potencial de matriz mesangial e colágeno no tecido renal [28,30]. Os casos de hipertrofia renal levam à diminuição da capacidade de filtração glomerular, sinal característico de insuficiência renal. Neste estudo evidenciado através de parâmetros que avaliam a função renal,

tais como baixa creatinina sérica e proteína e aumento dos níveis de ureia. Outra possibilidade para o aumento glomerular é a necessidade compensatória. Isso acontece quando a lesão glomerular diminui a eficiência da maioria dos glomérulos, sobrecarregando os glomérulos funcionais com aumento da hipertensão renal e consequente hipertrofia, resultando na glomerulosclerose. Esses resultados histológicos associados com lesões vasculares causadas pelo diabetes levam ao aumento da pressão arterial, aumentando o volume glomerular [35-41].

Outra situação que contribui para a glomerulosclerose é a adesão de tufos glomerulares à cápsula de Bowman, o que é especialmente descrito em casos de proliferação desorganizada da matriz mesangial. Isso tem sido descrito em estudos sobre indução de insuficiência renal e estudos mais longos, muitas vezes relacionados com casos de doenças crônicas, como diabetes e obesidade [36,42-45]. O aumento do espaço de Bowman está diretamente relacionado a um maior volume de líquido depositado nesse espaço. Isto é, em geral, induzido pela necessidade dos glomérulos funcionais em suprir aqueles prejudicados pelas mudanças resultantes do diabetes [41,44]. O aumento do diâmetro glomerular, da área do tufo glomerular e da cápsula de Bowman geralmente acompanham o aumento deste espaço. Isso explica na fisiologia do sistema renal um efeito compensatório na tentativa de melhorar as deficiências de filtração que ocorrem no diabetes [46-48].

Outro resultado importante nos animais diabéticos foi a presença de células epiteliais dos túbulos contorcidos distais apresentando degeneração celular, tais como tumefação. Este resultado também foi observado em outros estudos [49-52] onde células tumefeitas com inclusões basofílicas intracitoplásmicas vesiculares, posteriormente hiperacoradas pelo PAS; apresentaram características histológicas

compatíveis com o acúmulo de glicogênio nas células epiteliais dos túbulos distais de animais diabéticos. Essas alterações estão relacionadas a um consequente aumento da reabsorção de glicose no filtrado glomerular e devido a ineficiência da atividade da insulina [50-52], ou ainda problemas ligados a reabsorção de substâncias pelos túbulos renais. Ou seja, essa reabsorção acontece devido à alta concentração de glicose no ultrafiltrado, que deveria ser excretada, mas que é reabsorvida e não metabolizada pelas células tubulares, salienta-se ainda que a presença da glicose contribui para a glicosilação das membranas basais glomerulares e tubulares. Resultados semelhantes foram descritos em trabalhos que abordam modelos experimentais de nefropatia diabética em diferentes graus de evolução [53-57]. Em estudo com animais obesos em modelo de nefropatia diabética [54,58-61] foram evidenciadas células epiteliais tubulares com tumefações, posteriormente coradas pelo PAS, sendo que esse aspecto histológico sugere um estado geral de poliúria e proteinúria. O aumento da matriz mesangial se faz a partir da deposição também do colágeno no parênquima renal. A hipertrofia renal, juntamente com o aumento da pressão arterial, e a falta de metabolização de glicose, que leva ao aumento da produção de produtos da glicação avançada juntamente com o aumento da expressão das espécies reativas de oxigênio levam a lesão renal [56-59]

O acúmulo de glicogênio evidenciado nos animais diabéticos é explicado fisiologicamente quando interpretado com base na composição do ultrafiltrado urinário que contém substâncias capazes de serem reabsorvidas, seja por transporte ativo ou passivo, algumas parcialmente e outras completamente como é o caso da glicose. A glicose quando presente no filtrado glomerular em concentrações muito altas é reabsorvida e deposita-se em vesículas no citoplasma

de células tubulares [56-61]. Em casos de nefropatias diabéticas persistentes, o que não se aplica nesta pesquisa, demonstraram a progressão das lesões tubulares para lesões irreversíveis como a necrose, a fibrose e apoptose das células tubulares [59-61].

Os animais diabéticos (D) apresentaram níveis de peroxidação lipídica superiores aos do grupo normoglicêmico (N). Esse resultado demonstra que características já conhecidas de aumento das espécies reativas de oxigênio em diabéticos [61,62]. Esse estado de oxidação, contribui de maneira significativa para que lesões renais se desenvolvam e comprometam o funcionamento renal [63-66], sendo possível a observação dessas lesões em análises histológicas como aconteceu em nosso estudo. Pacientes não diabéticos apresentam níveis menores de peroxidação lipídica, o que de maneira indireta contribui para a proteção de órgãos vitais de lesões decorrentes do DM [61-64]. O presente trabalho apresentou níveis de peroxidação lipídica em animais diabéticos tratados com EAF (D-EAF) parecidos com os níveis de animais normoglicêmicos (N) e normoglicêmicos tratados com EAF (N-EAF), esses dados sugerem uma capacidade de proteção do EAF frente a lesões oxidativas de lipídios da membrana. Salientamos que as lesões oxidativas não aconteceram em proteínas, já que os níveis de proteínas carboniladas foi similar em todos os grupos.

A lesão de membranas celulares colabora para que as injúrias do tecido renal aconteçam e se instale quadros de glomeruloesclerose focal ou difusa. Aurtos tem demonstrado que níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROS) no tecido renal colaboram para que a injúria celular aconteça e a capacidade funcional dos rins fique diminuída [65-69]. A expansão mesangial e hialinização glomerular sofre estímulo em ambientes de lesão oxidativa, salienta-se

porém que na maioria dos casos a lesão celular acontece logo nos primeiros momentos de aumento das EROS no tecido, com posterior estabilização dos níveis de peroxidação lipídica no local da lesão [69-72], conforme encontramos em nosso estudo. A degeneração glicogênica também é estimulada por lesões de membranas celulares, devido a diminuição da seletividade das membranas, e entrada de moléculas no citoplasma celular que não são metabolizadas [69-72].

A *T. catigua* é uma espécie bioativa muito requisitada como matéria-prima industrial e de exportação [13,73]. Realizou-se a caracterização farmacognóstica das cascas de amostras e os dados obtidos confirmaram a presença dos grupos de flavonóides, antracênicos livres, taninos e saponinas, bem como a ausência de alcalóides, mucilagens, cumarinas e óleos essenciais; a reação de Stiasny confirmou que os taninos presentes são dos tipos condensados [74]. De acordo com TANG et al., (2007) [75] a *T. catigua* apresenta uma forte atividade antioxidante, devido a esta propriedade, a *T. catigua* foi utilizada neste experimento.

Nos animais diabéticos tratados com EAF foi evidenciado uma melhora dos parâmetros do perfil bioquímico, proteínas totais com consequente redução na perda de peso. Tais resultados corroboram com estudos que utilizaram outros produtos naturais, com a avaliação dos mesmos parâmetros [20,28]. A análise bioquímica mostrou que *T. catigua* pode diminuir os níveis de glicose no sangue, embora fique aquém do desejado. O mecanismo de redução de glicose no sangue não foi elucidado, mas sugere-se que o extrato *T. catigua* apresenta a capacidade de proteger as células pancreáticas das lesões, principalmente inflamatórias (insulite), que ocorre no modelo experimental da indução do DM tipo 1 pela STZ [76].

Nesta pesquisa, o extrato de *T. catigua* mostrou o efeito protetor no tecido renal preservando a arquitetura dos glomérulos renais e níveis de proteínas

totais no processo de filtração [53,54,77-79]. nota-se que a arquitetura histológica do rim se apresentou melhor preservada. Com diminuição da tumefação das células epiteliais dos túbulos distais, bem como a diminuição das vesículas intracelulares de glicogênio [57]. As bordas em escova das células tubulares também estavam mais evidentes no grupo D-EAF, bem como o depósito de células mesangiais diminuído e a membrana basal menos espessa [57]. A preservação da estrutura histológica foi evidenciada também através de menor índice de glomeruloesclerose, expansão mesangial e acúmulos de glicogênio principalmente. É possível que o tratamento com EAF possa ter melhorado a morfologia e função renal devido à redução da glicose no sangue, que por consequência reduz a glicação enzimática de proteínas e cascatas e que acarretam em elevação das espécies reativas de oxigênio. Entretanto também pode estar relacionado ao efeito antioxidante da própria *T. catigua* por conter uma grande quantidade de polifenóis e também atividade anti-inflamatória [19,13,15,16,73,80-89]. A proteção contra um ambiente inflamatório, faz com que as alterações glomerulares diminuam e continuamente apresentando melhora da capacidade renal. Pacientes que apresentam melhora no quadro inflamatório produzido pelo DM, demonstram melhor capacidade renal e diminuição dos fatores de riscos para lesões renais e vasculares.

Nos animais normoglicêmicos administrados com a EAF não foram observadas alterações nos componentes bioquímicos analisados e também nos parâmetros histológicos sendo um indicativo que a EAF não apresentou capacidade de lesar os tecidos.

De acordo com os resultados metabólicos, bioquímicos, morfométricos e histopatológicos apresentados no presente trabalho concluímos que a EAF de *T. catigua* apresentou capacidade de proteger os animais frente a complicações

decorrentes do DM, colaborando para a melhora dos parâmetros bioquímicos e metabólicos, levando a diminuição dos ambientes que promovem lesão renal, promovendo dessa forma a proteção da arquitetura dos glomérulos renais em animais diabéticos tratados.

5.REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica : diabetes mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 160 p.
2. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17(1):24-38.
3. American Diabetes Association, 2011. Standards of Medical Care in Diabetes 2011. *Diabetes Care* 2011 Jan; 34(Supplement 1): S11-S61
4. Arya A, Yadav HN, Sharma PL. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Mol. Cell Biochem* 2011; 354, 57-66.
5. Barnett DM, Krall LP. A história do diabetes. In KAHN, CR. et al. *Joslin: Diabetes Mellito*. 14a. ed., Porto Alegre: Artmed, 2009. cap. 1, p. 15-31.
6. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.
7. American Diabetes Association, 2012. of Standards Medical Care in Diabetes—2012. *Diabetes Care* 2012 Jan; 35(Supplement 1): S11-S63
8. International Diabetes Federation. (2013). *IDF Diabetes Atlas*, 6th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.
9. Gross, JL, Azevedo, MJ, Silveiro, SP, Canani, LH, Caramori, ML, Zelmanovitz, T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*. v.28, n.1, Jan., 2005 ARDUINO, F. *Diabetes Mellitus*. 3ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1980.
10. American Diabetes Association, 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1, S81-90
11. Dunnill MS. *Pathological Basis of Renal Disease*. Balliere Tindall: Oxford; 1976
12. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016) / Adolfo Milech...[et. al.]; organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.
13. Pizzolatti MG, Venson AF, Smânia AJ, Smânia EFA, Braz-Filho R. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Zeitschrift der Naturforschung* 2002; 57(c); 483-488,
14. Resende FO, Rodrigues Filho, E, Luftamnn, H, Petereit F, Mello JCP. Phenylpropanoids substituted flavan-3-ols from *Trichilia catigua* and their in vitro antioxidative activity, *J. Braz. Chem. Soc.* 2011; 22; 2087-2093,
15. Bonassoli VT, Chassot JM, Longhini R, Milani H, Mello JCP, Oliveira RMW. Subchronic administration of *Trichilia catigua* ethyl-acetate fraction promotes antidepressant-like effects and increases hippocampal cell proliferation in mice, *J. Ethnopharmacol.* 2012; 143; 179-184.

16. Chassot JM, Longhini R, Gazarini L, Mello JCP, Oliveira, RMW. Preclinical evaluation of *Trichilia catigua* extracts on the central nervous system of mice. *J. Ethnopharmacol.* 2011; 137; 1143– 1148.
17. Resende FO. *Trichilia catigua*: Avaliação Farmacognóstica, Fitoquímica e Biológica *in vitro*. Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual de Maringá. 2007.
18. Longhini, R. Klein, T., Bruschi, M.L., Silva Jr, W.V., Rodrigues, J., Lopes. N.P., Mello, J.C.P., Development and validation studies for determination of phenylpropanoid-substituted flavan-3-ols in semipurified extract of *Trichilia catigua* by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journaul Separation of Science.* 36 (7): 2013, 1247–1254
19. Yin J, Xing H, Ye J. Efficacy of Berberine in Patients with Type 2 Diabetes. *Metabolism* 2008; 57(5): 712–717.
20. Guo C, Zhang C, Li L, Wang Z, Xiao W, Yang Z, Hypoglycemic and hypolipidemic effects of oxymatrine in high-fat diet and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2014; 21, 807-814.
21. Freitas, FPS. Análise Histológica de Rins de Camundongos na Fase Inicial de Desenvolvimento da Insuficiência Renal. Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Espírito Santo. 2011
22. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: na assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *FreeRadicBiol Med.* 1991;10(2):93–100.
23. Oliveira FJA, Cecchini R. Oxidative stress of liver in hamsters infected with *Leishmania (L.) chagasi*. *J Parasitol* 2000;86:1067–1072.
24. Reznick AZ, Packer L (1994). Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233, 357–363.
25. Bernardes SS, Guarnier FA, Marinello PC, Armani A, Simao ANC, Cecchini R. Reactive oxygen species play a role in muscle wasting during thyrotoxicosis. *Cell Tissue Res* 2014; 357:803-814.
26. Lowry OH; Rosenbrough NJ; Farr AL; Randall, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951.v. 193, p. 265-75,
27. Miller GL. Protein determination for larger numbers of samples. *Anal Chem.* 1959.v. 31, p. 964,
28. Honore SM, Cabrera WM, Genta SB, Sanchez SS, Protective effect of yacon leaves decoction against early nephropathy in experimental diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50; 1704-1715.
29. World Health Organization (OMS). Diabetes: World Health Organization Fact Sheet. August, 2011.
30. Castro MCN; Marcello GCG; Alencar NX, Ferreira AMR. Avaliação da relação proteína-creatinina urinária em gatos com doença renal crônica. *Pesq. Vet. Bras* 2009; 29 (8):605-609
31. Brasileiro FG. *Bogliolo Patologia.* 8ed. Rio de Janeiro: Gen Guanabara Koogan; 2011

32. Lima CM, Lima AK, Melo MGD, Dória GAA, Leite BLS, Serafini. MR, Albuquerque-Júnior, RLC, Araújo, AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena* 2014; 10 (03).
33. Levey AS, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from kidney disease: improving global outcomes. *Kidney International* 2005;67(6): 2089-2100.
34. Sancho LG, Dain S. Análise de custo-efetividade em relação às terapias renais substitutivas: como pensar estudos em relação a essas intervenções no Brasil? *Caderno de Saúde Pública* 2008; 24 (6): 1279-1290.
35. Ibrahim MA, Islam MS. Anti-diabetic effects of the acetone fraction of *Senna singueana* stem bark in a type 2 diabetes rat model. *J Ethnopharmacol* 2014; 153: 392-399.
36. Zhang H, Zhao T, Gong Y, Dong X, Zhang W, Sun S, Wang H, Gu Y, Lu X, Yan M, Li P. Attenuation of diabetic nephropathy by Chaihuang-Yishen granule through anti-inflammatory mechanism in streptozotocin-induced rat model of diabetics. *J Ethnopharmacol* 2014, 151: 556-564.
37. Kriz W, Lehir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases – Insights from animal models. *Kidney International* 2005; 67(2): 404-419.
38. Yasuno K, et al. Early-onset podocyte injury and glomerular sclerosis in OsborneMendel rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2010; 72(10): 1319-1327.
39. Pu, GJ. et al. Effects of no. 2 renal failure recipe on expressions of cyclooxygenase2 and -1 mRNAs in rats with chronic renal failure. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 2009; 7(11): 1067-1072.
40. Jung O et al. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase promotes albuminuria in mice with progressive renal disease. *PLoS One*. 5(8): 1-10, 2010.
41. Zatz R. *Fisiopatologia Renal*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
42. Da Silva GV, Gonçalves AB, Ortega KC Mion Jr D. Alterações renais na hipertensão arterial sistêmica. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2008; 2: 175-81.
43. Fiorino P, Yokota R, Muller CR, Farah V, Fonteles MC. Effects of hyperlipidic diet consumption from weaning to adult rats, on renal and vascular function. *The FASEB Journal*, 2011.
44. Mogensen CE. Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes. *J Intern Med* 2003; 254:45-66.
45. Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney Int* 2002;61:1086 -97.
46. Manda G, Checherita AI, Comanescu MV, Hinescu ME, Redox Signaling in Diabetic Nephropathy: Hypertrophy versus Death Choices in Mesangial Cells and Podocytes Mediators of Inflammation Volume 2015.
47. Boor P, Celec P, Behuliak M, Grančič P, Kebis A, Kukan M, Pronayová N, Liptaj T, Ostendorf T, Šebeková K. Regular moderate exercise reduces advanced

- glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats *Metabolism Clinical and Experimental* 2009; 58: 1669–1677.
48. Kuo CW, Shen CJ, Tung YT, Chend HL, Chen YH, Chang WH, Cheng KC, Yang SH, Chen CM. Extracellular superoxide dismutase ameliorates streptozotocin-induced rat diabetic nephropathy via inhibiting the ROS/ERK1/2 signaling. *Life Sciences* 2015; 135:77–86.
 49. Anderson JW, Stowring L. Glycolytic and gluconeogenic enzyme activities in renal cortex of diabetic rats. *Am J Physiol.* 1973; 224(4):930-6.
 50. Slyvka Y, Malgor R., Inman SR., Ding J, Heh V, Nowak FV. Antioxidant diet and sex interact to regulate NOS isoform expression and glomerular ... *Acta Histochemica* 2016; 118, 183-193.
 51. Sai Varsha MKN, Raman T, Manikandan R, Dhanasekaran G. Hypoglycemic action of vitamin K1 protects against early-onset diabetic nephropathy in streptozotocin-induced rats *Nutrition* 2015; 31: 1284–1292.
 52. Dunnill, M.S. *Pathological Basis of Renal Disease.* Oxford. 1976
 53. Kim, YS, Jung, DH, Sohn, E, Lee, YM, Kim, CS, Kim, JS. Extract of *Cassiae* semen attenuates diabetic nephropathy via inhibition of advanced glycation end products accumulation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 2014; 21:734-739.
 54. Lekshmi, RK, Rajesh, R, Mini, S. Ethyl acetate fraction of *Cissus quadrangularis* stem ameliorates hyperglycaemia-mediated oxidative stress and suppresses inflammatory response in nicotinamide/streptozotocin induced type 2 diabetic rats. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 2015; 22:952-960.
 55. Omaraa EA, Nadab SA, Farraga ARH, Sharafa WM, El-Toumyc SA. Therapeutic effect of *Acacia nilotica* pods extract on streptozotocin induced diabetic nephropathy in rat *Phytomedicine* 2012; 19: 1059– 1067.
 56. O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB. J.* 1988; 2(8): 2339-47.
 57. Papademetriou V, Lovato L, Doumas M, Nysten E, Mottl A, Cohen RM, Applegate WB, Puntakee Z, Yale JF, Cushman WC. Chronic kidney disease and intensive glycemic control increase cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes. *Kidney Int.* 2015; 87(3):649-59
 58. Brande GL, O'shea MH, Mulhrn JG. Tubulointerstitial diseases. *American Journal of Kidney Diseases*, 2005; 46(3):560-572.
 59. Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, Asfar S. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Brit. J. Nutr.* 2008; 100: 652–659.
 60. Ramesh B, Saravanan R, Pugalendi KV. Effect of dietary substitution of Groundnut oil on blood glucose, lipid profile, and redox status in streptozotocin-diabetic rats. *Yale J. Biol. Med.* 2006; 79: 9-17.
 61. Striker GE, Eastman RD, Striker LJ. Diabetic nephropathy: molecular analysis of extracellular matrix and clinical studies update. *Nephrol. Dial. Transplant* 1996; 11(5):58-61.

62. Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse Oxidativo: Revisão da Sinalização Metabólica no Diabetes Tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(7):1096-1105.
63. Teles YCF, Monteiro RP, Oiveira MS, Ribeiro-Filho J. O papel do estresse oxidativo na síndrome metabólica. *J Health Sci Inst.* 2015;33(1):89-93.
64. Costa-Hong V, Bortolotto LA, Jorgetti V, Consolim-Colombo F, Krieger EM, Lima JJG. Estresse Oxidativo e Disfunção Endotelial na Doença Renal Crônica. *Arq Bras Cardiol* 2009;92(5):413-418.
65. Modaresi A, Nafar M, Sahraei Z. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis.* 2015; 9(3):165-179. Small DM, Coombes JS, Bennett N, Johnson DW, Gobe GC. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 2012;17(4): 311-321.
66. Kao MP, Ang DS, Pall A, Struthers AD. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens.* 2010;24(1): 1-8.
67. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 2011; 17(3); 3-8.
68. Gago-Dominguez M, Castelao JE. Lipid peroxidation and renal cell carcinoma: further supportive evidence and new mechanistic insights. *Free Radic Biol Med.* 2005; 40 (4), 721-733.
69. Hara S, Kobayashi N, Sakamoto K, Ueno T, Manabe S, Takashima Y, Hamada J, Pastan I, Fukamizu A, Matsusaka T, Nagata M. Podocyte Injury–Driven Lipid Peroxidation Accelerates the Infiltration of Glomerular Foam Cells in Focal Segmental Glomerulosclerosis. 2015, 185 (8); 2118-2131.
70. Wardle EN. Glomerulosclerosis and lipid peroxidation. 1993; 64:487.
71. Lorençoni RMR, Pelai EB, Godoy MF, Dos Santos ACA, Miyoshi, LH, De Oliveira RNP, Padovani CR, Fregonesi CEPT, Camargo Filho JCS. Histology and renal lipoperoxidation in rats exercised on a treadmill and submitted to water restriction. *Int. J. Morphol.*, 2015.33(2):660-665.
72. Pizzolatti MG; Koga AH; Grisard EC; Steindel M. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*, v.9, p.422-426, 2002
73. Oliveira C.H. et al. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paulliniacupana*, *Trichilia catigua* Ptychopetalumolacoides and Zingiberofficinale (Catuama) in healthy volunteers. *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 54-57, 2005.
74. Tang W. et al. Antioxidant Phenylpropanoid-Substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*. *Journal of Nature Products*, v. 70, p. 2010–2013, 2007.
75. Balda CA, Pacheco-Silva. Aspectos Imunológicos do Diabetes Melito Tipo 1. *Rev. Assoc. Med. Bras.* v. 45, n. 2, 175-180, 1999.
76. Ghosh S, Suryawanshi SA. Effect of *Vinca rosea* extracts in treatment of alloxan diabetes in male albino rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 2001; 39(8): 748-759.

77. Murali R, Srinivasan S, Ashokkumar N. Antihyperglycemic effect of fraxetin on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 2013; 95:1848-1854.
78. Mutinga M; Rosenbluth A; Tenner SM; Odze RR; Sica GT, Banks PA. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? *Int J Pancreatol* 2000; 28: 91-95.
79. Souza LA, Moscheta IS, Mourão KSM, Silvério A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 2001, v.44, n.4, p.383-394.
80. Corrêa, MP. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984, v.3, p.545-555.
81. Vas ZR; Mata LV; Calixto JB. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytotherapy Research*, 1997, v.11, p.101- 06.
82. Calixto JB; Cabrini DA. Herbal medicine Catuama induces endothelium-dependent and –independent vasorelaxant action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. *Phytother. Res.*, 1997, v.11, p. 32-38.
83. Antunes E; Gordo WM; De Oliveira JF; Teixeira CE, Hyslop S; Denucci G. The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by herbal medicine Catuama® and its constituents. *Phytotherapy Research*, 2001, v.15, p.416-421.
84. Campos MM; Fernandes ES; Ferreira J; Bortolanza LSB; Santos ARS; Calixto J.B. Pharmacological and neurochemical evidence for antidepressant-like effects of the herbal product Catuama. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2004, v.78, p.757–764.
85. Baby AR; Migliato KF; Maciel CPM; Zague V; Pinto ASO; Salgado HRN, Kaneko TM, Velasco MVR. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 2007, v. 43, n. 3, p. 405-412.
86. Baby AR, Maciel CPM, Kaneko TM, Velasco, MVR. UV-spectrophotometric determination of bioflavonoids from semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. standardized extract: analytical method validation and statistical procedures. *J. AOAC Int.*, Gaithersburg, 2006, v. 89, n. 6, p.1532-1537.
87. Pontieri V, Scalabrini Neto A, Camargo AFF, Koike MK, Velasco IT. The herbal drug Catuama reverts and prevents ventricular fibrillation in the isolated rabbit heart. *J. Electrocardiol.*, 2007.v. 40, p.534-534,
88. Viana AF, Maciel IS, Motta EM, Leal PC, Pianowski L, Campos MM, Calixto JB. Antinociceptive activity of *Trichilia catigua* hydroalcoholic extract: new evidence on its dopaminergic effects. *eCAM*, 2009, p. 1-8.
89. Quintão NLM, Ferreira J, Beirith A, Campos MM, Calixto JB. Evaluation of the effects of the herbal product Catuama® in inflammatory and neuropathic models of nociception in rats. *Phytomedicine*, 2008,bv. 15, p. 245-252.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 – Efeito da Fração Acetato de Etila (EAF) sobre a massa corporal inicial (IMC) e final (FMC), ganho de peso (WG) e glicose (GLI) dos animais dos grupos: normoglicêmico – N; normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; diabético – D e diabético administrado com EAF – D-EAF. n= 6 animais por grupo. Resultado expresso como média ± erro padrão.

	N	N-EAF	D	D-EAF
IMC (g)	352.0 ± 5.8	361.7 ± 9.3	345.9 ± 4.3	355.6 ± 5.7
FMC (g)	454.1 ± 15.2	428.6 ± 15.7	279.1 ± 11.7*	325.6 ± 10.5
WG (g)	102.1 ± 7.3	66.9 ± 12.5	- 66.8 ± 8.31*	- 30.0 ± 5.8
GLI (mg/dL)	119.4 ± 10.5	105,3 ± 5,3	534,6 ± 9,6 *	447,3 ± 32,1#

* p < 0.001(D vs N); #p < 0,01 (D-EAF vs D)

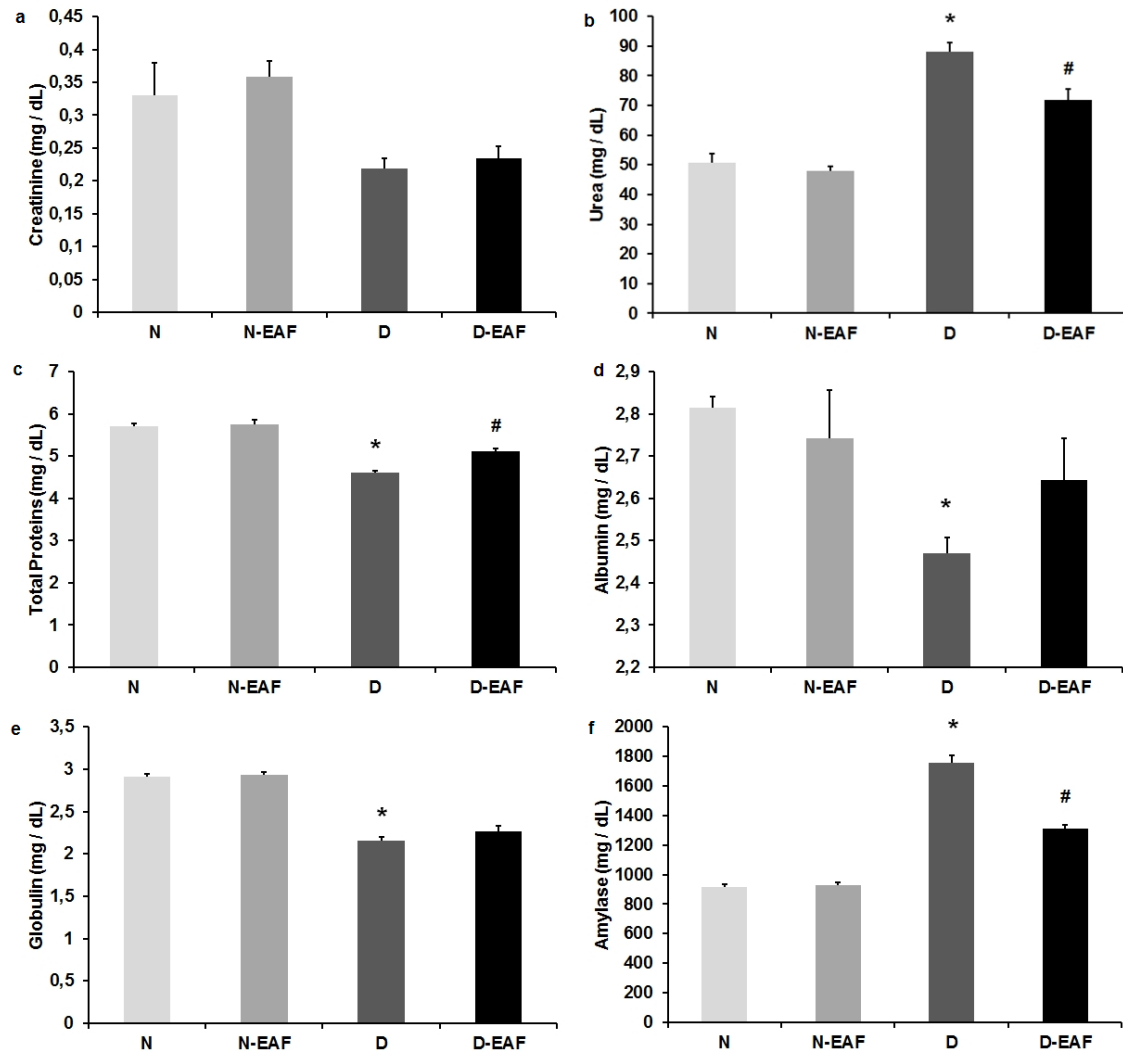


Figura 1 – Efeito da Fração Acetado de Etila (EAF) sobre os níveis séricos de (a) Creatinina; (b) Ureia; (c) Proteínas Totais; (d) Albumina; (e) Globulina e (f) Amilase nos grupos: normoglicêmico – N; normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; diabético – D e diabético administrado com EAF – D-EAF. n= 6 animais por grupo. Resultado expresso como média \pm erro padrão. * $p < 0.05$ (D vs N); # $p < 0,05$ (D-EAF vs D).

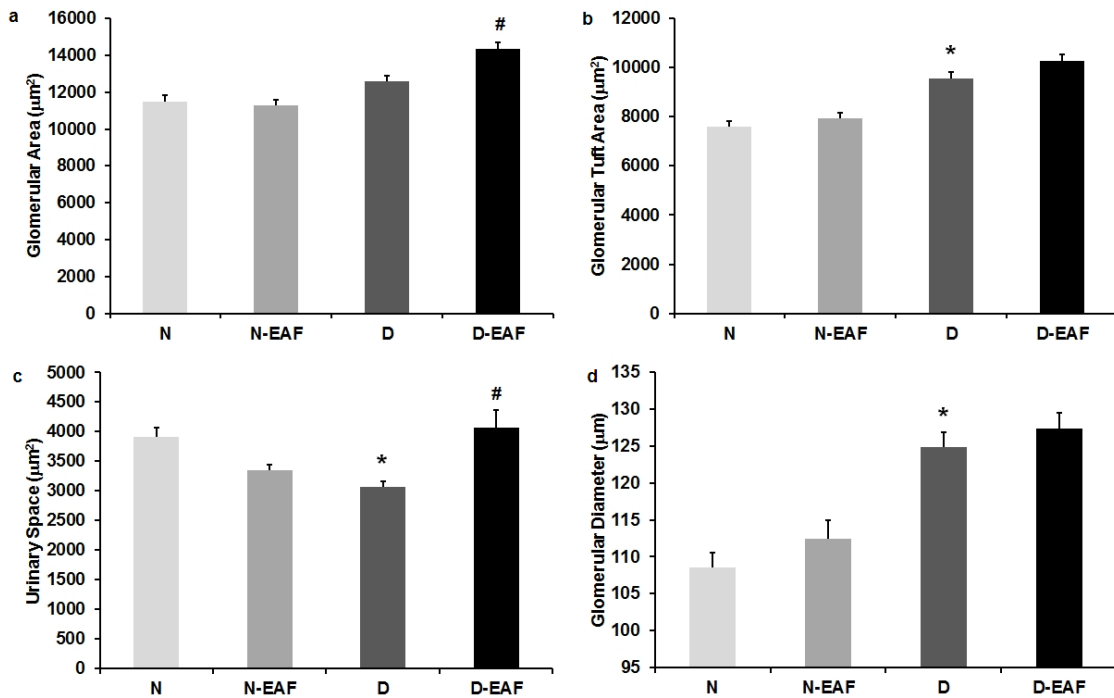


Figura 2 – Efeito da Fração Acetado de Etila (EAF) sobre as características morfométricas: (a) Área do Glomérulo; (b) Área do Tufo Glomerular; (c) Espaço urinário e (d) Diâmetro Glomerular nos grupos: normoglicêmico (N); normoglicêmico administrado com EAF (N-EAF); diabético (D) e diabético administrado com EAF (D-EAF). n= 6 animais por grupo. Resultado expresso como média \pm erro padrão. * $p < 0.01$ (D vs N); # $p < 0,01$ (D-EAF vs D).

a Efeito do Tratamento com EAF sobre o Escore de Glomerulosclerose e Expansão Mesangial

	N	N-EAF	D	D-EAF
Glomerulosclerose	-	-	+++	++
Expansão Mesangial	-	-	+++	++

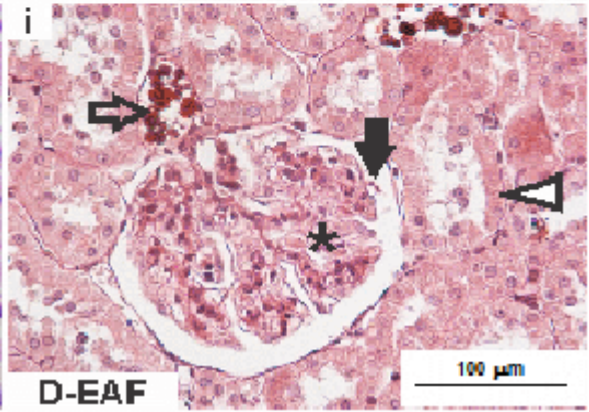
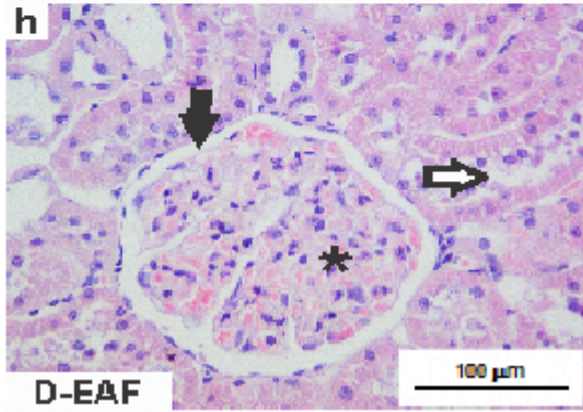
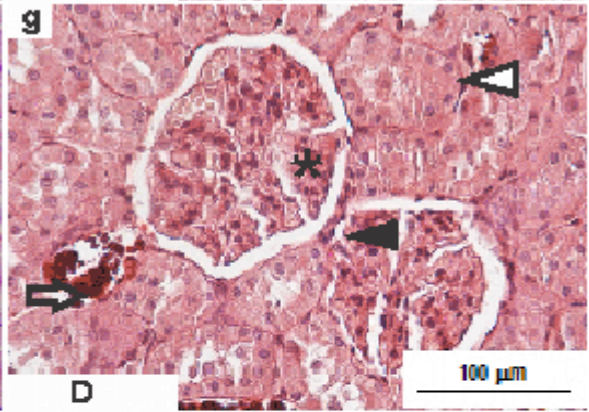
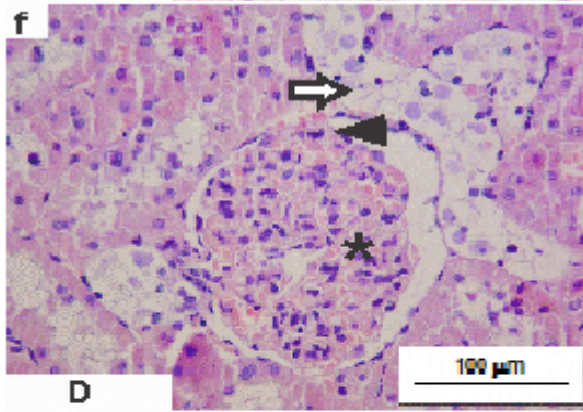
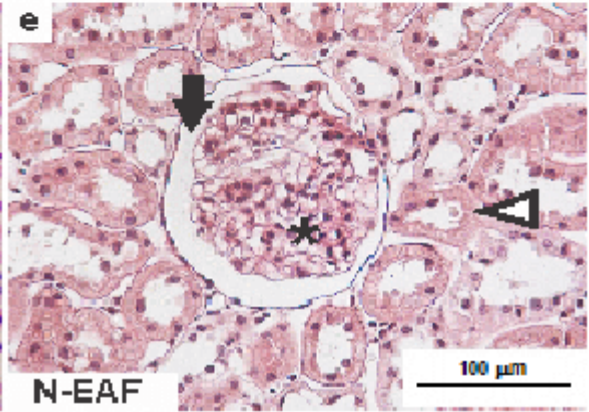
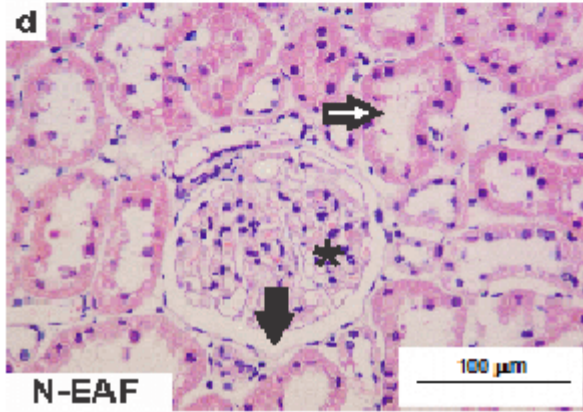
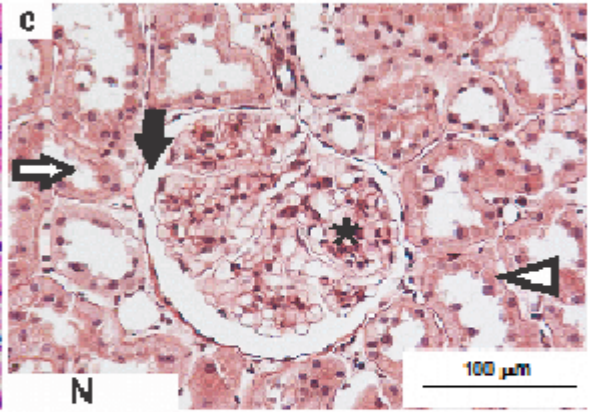
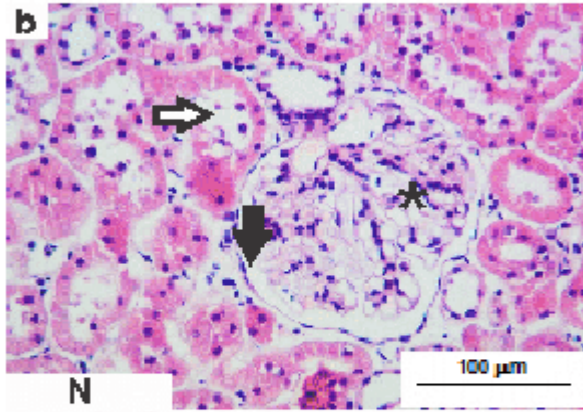


Figura 3: Efeito do EAF sobre o escore de Glomeruloesclerose e Expansão Mesangial **(a)** e características histológicas do rim nos grupos: **(b, c)** normoglicêmico – N; **(d, e)** normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; **(f, g)** diabético – D e **(h, i)** diabético administrado com EAF – D-EAF. Asteriscos: Tufos glomerulares com capilares normais nos grupos N e N-EAF **(b, c, d, e)** e tufos glomerulares com expansão mensangial intensa no grupo D **(f, g)** e expansão mensangial moderada no grupo D-EAF **(h, i)**; Setas Brancas: túbulos renais sem a presença de vesículas de glicogênio nos grupos N e N-EAF **(b, c, d, e)** e com presença de vesículas de glicogênio nos grupos D e D-EAF **(f, g, h, i)**; Setas Pretas: Espaço urinário preservado nos grupos N, N-EAF e D-EAF **(b, c, d, e, h, i)**; Cabeça de Seta Preta: aderência do tufo glomerular a Cápsula de Bowman no grupo D **(f, g)**; Cabeça de Seta Branca: Membranas basais normais nos grupos N, N-EAF e D-EAF **(c, e, i)** e membrana basal espessada no grupo D **(g)**. n= 6 animais por grupo. Fotomicrografias representativas **(b, d, f, h)** - Coloração de Hematoxilina-Eosina e **(c, e, g, i)** - Coloração de PAS – Ácido Periódico de Schiff. Barra de 100 µm. Aumento de 400x

a Efeito do Tratamento com EAF sobre o Escore da Degeneração Glicogênica

	N	N-EAF	D	D-EAF
Degeneração Glicogênica	-	-	+++	++

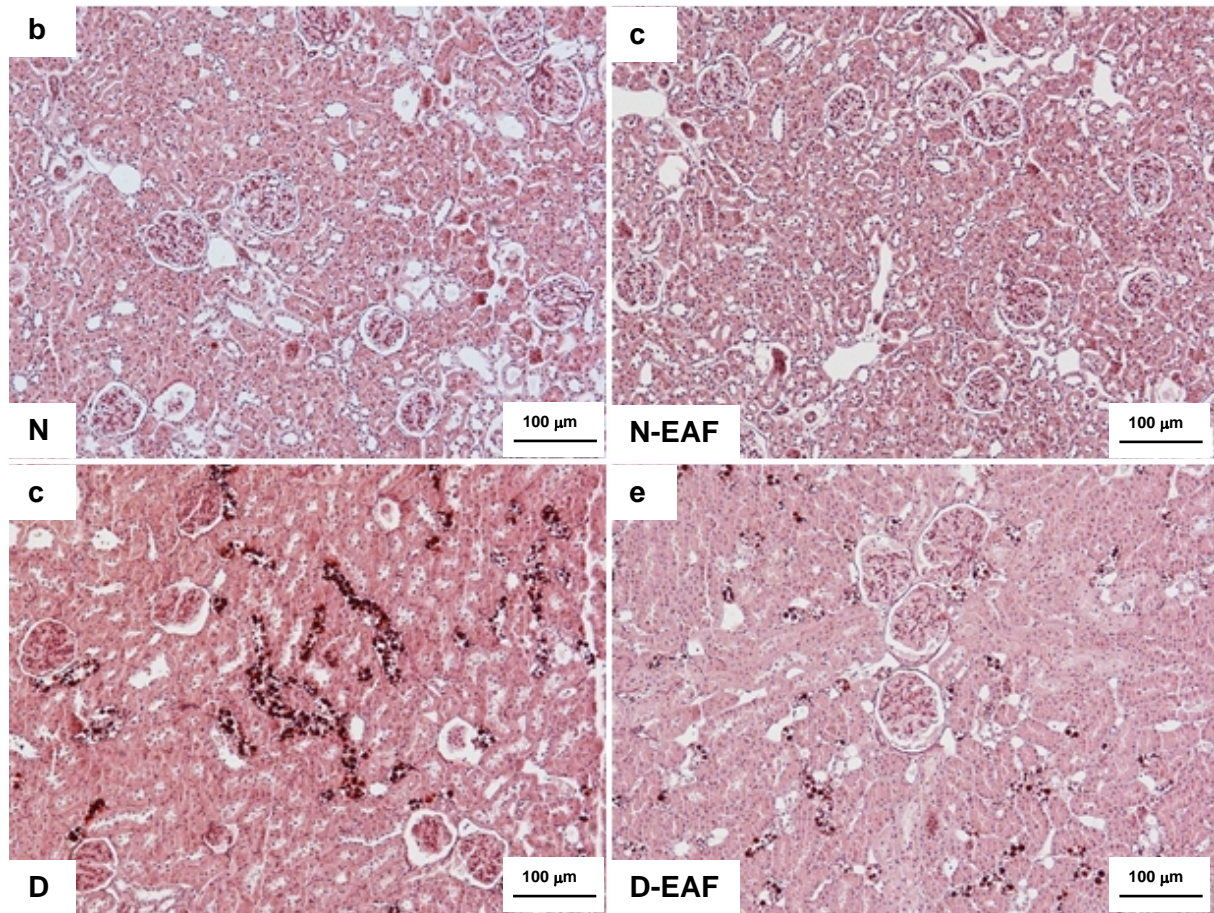


Figura 4: Efeito do EAF sobre o escore de Degeneração Glicogênica **(a)** e características histológicas do rim nos grupos: **(b)** normoglicêmico – N; **(c)** normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; **(d)** diabético – D e **(e)** diabético administrado com EAF – D-EAF. Setas pretas: presença de vesículas intracitoplasmáticas preenchidas por glicogênio (coloração púrpura) nos grupos D **(d)** e D-EAF **(e)**. Fotomicrografias representativas– Coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS)).

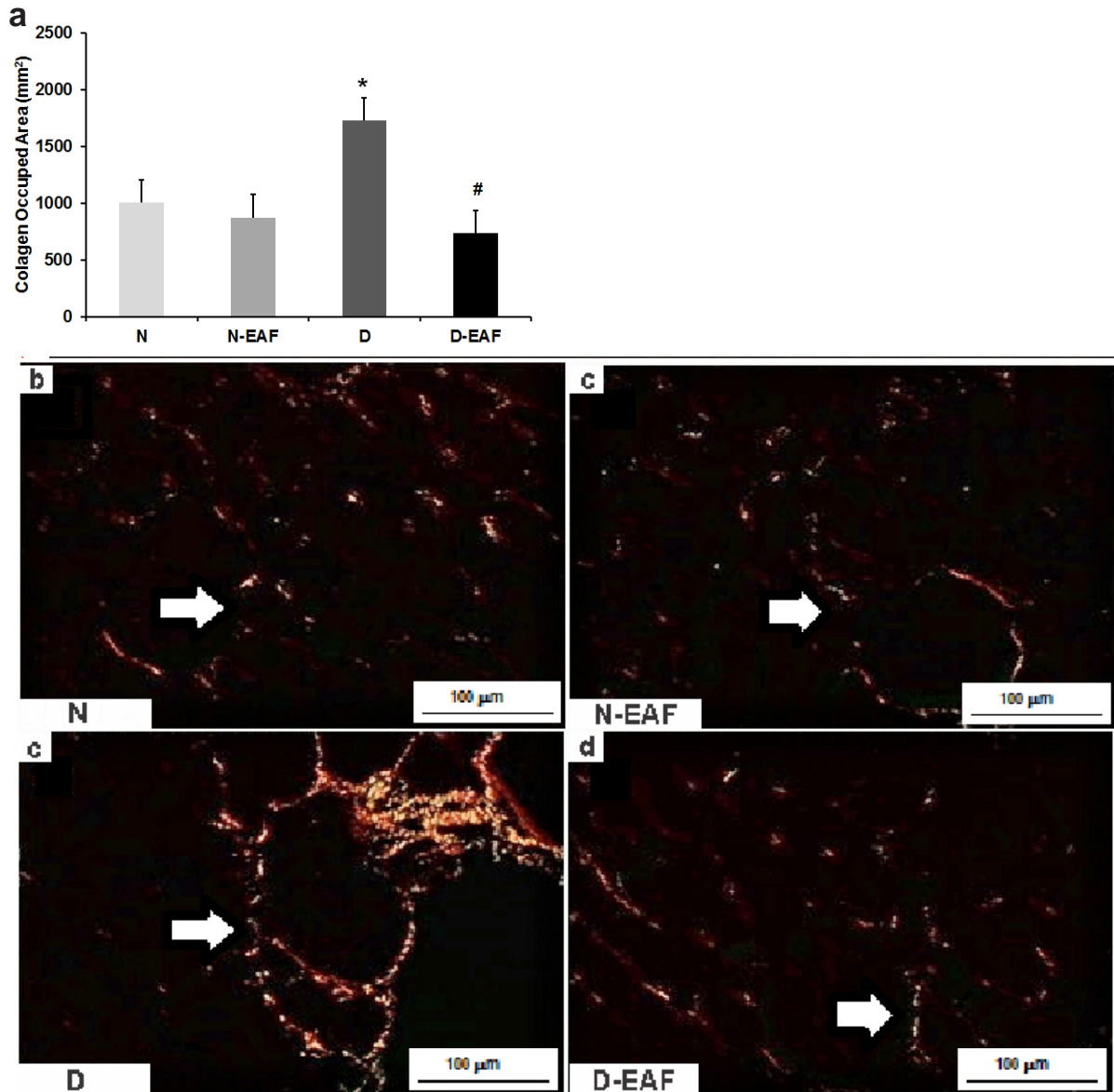


Figura 5: Efeito do EAF sobre os dados morfométricos da Área Ocupada pelo Colágeno **(a)** e características histológicas do rim nos grupos: **(b)** normoglicêmico – N; **(c)** normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; **(d)** diabético – D e **(e)** diabético administrado com EAF – D-EAF. Setas brancas: marcação do colágeno em microscopia de polarização. Fotomicrografias representativas (Aumento de 200x – Microscopia de Polarização – Coloração de Picrosirius – (Sirius Red). Barra de 100 μ m. Aumento de 400x. * $p < 0,01$ (D vs N); # $p < 0,01$ (D-EAF vs D).

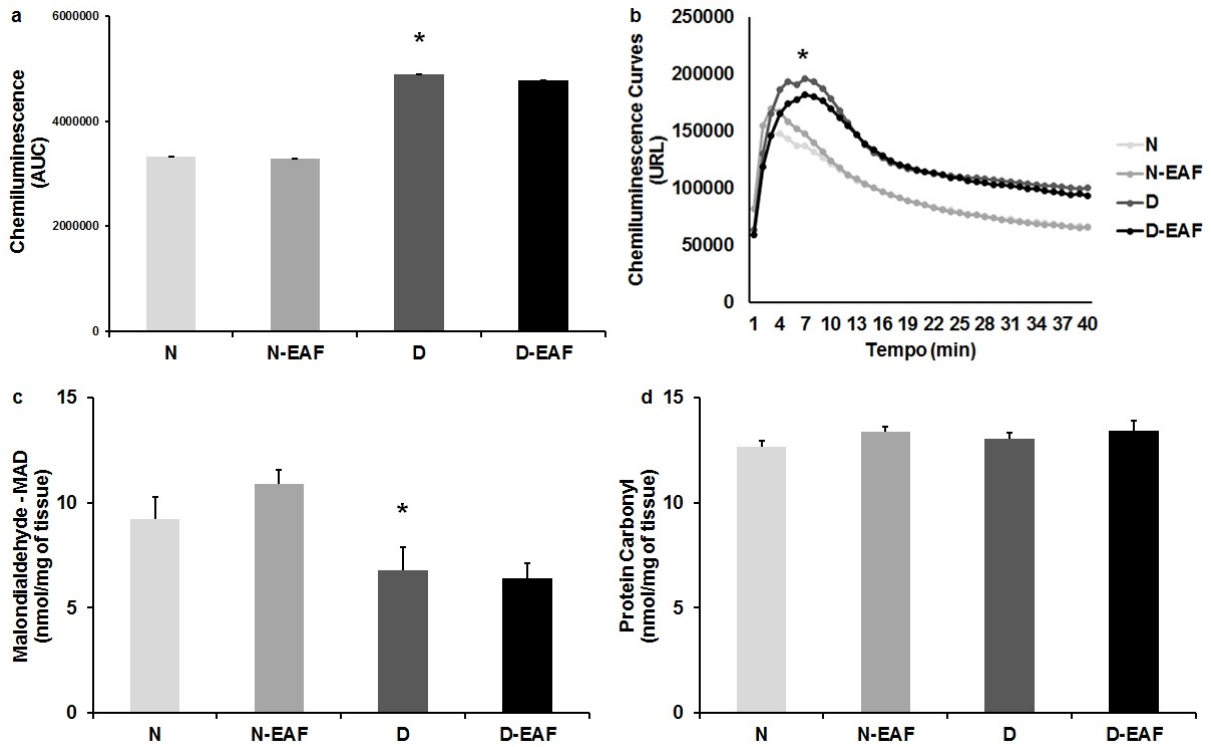


Figura 6 – Efeito da Fração Acetado de Etila (EAF) sobre os dosagem de parâmetros de estresse oxidativo a) Área Sob a Curva de Quimioluminescência; b) Curvas de Quimioluminescência; c) Malondialdeído e d) Proteína Carbonila, nos grupos: normoglicêmico – N; normoglicêmico administrado com EAF – N-EAF; diabético – D e diabético administrado com EAF – D-EAF. n= 6 animais por grupo. Resultado expresso como média ± erro padrão. * p < 0.001(D vs N); # p < 0,01 (D-EAF vs D);

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA