

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO
Croton cajucara BENTH SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS E A
EXPRESSÃO DO NF-κB EM FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS

Graziella Ramos Rodrigues

Orientadora: Prof. Dra. Norma Anair Possa Marroni

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DO
Croton cajucara BENTH SOBRE PARAMETROS OXIDATIVOS E A
EXPRESSÃO DO NF-κB EM FÍGADO DE RATOS DIABÉTICOS

*Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.*

Graziella Ramos Rodrigues

Orientadora: Prof. Dra. Norma Anair Possa Marroni

2010

R696e **Rodrigues, Graziella Ramos**

Efeito da administração do extrato aquoso do croton cajucara Benth sobre parâmetros oxidativos e a expressão do NF-κB em fígado de ratos diabéticos / Graziella Ramos Rodrigues ; orient. Norma Anair Possa Marroni. – 2010.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Diabetes mellitus 2. Estresse oxidativo 3. Croton 4. Plantas medicinais 5. NF-kappa B
6. Modelos animais de doenças I. Marroni, Norma Possa II. Título.

NLM: WK 810

Dedicatória

A concretização deste trabalho resulta de muito apoio, portanto, retorno meu reconhecimento, dedicando-o a

***Suzette Rodrigues**, minha mãe, pelo amor incondicional, pela compreensão e estímulo constantes, pela educação, por todos os abraços e palavras sábias nos momentos convividos e, em especial, por ser minha mãe a quem eu amo.*

***Paulo Rodrigues**, meu pai, grande incentivador. O meu anjo no céu.*

***Eduardo e Letícia Rodrigues**, meu mano e minha cunhada maravilhosa, por estarem ao meu lado em “todos os momentos”.*

***Em especial**, ao meu “amore”, **Rafael Mello**, pelas palavras de incentivo que me ajudaram a não desaminar, pela paciência dedicada e por estar sempre comigo.*

A todos aqueles que me amam e me amaram e que jamais deixaram de acreditar em mim.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Norma Possa Marroni, minha orientadora, que, entre outros papéis, acreditou em mim, agradeço a chance de trabalhar ao seu lado. Agradeço também a orientação, os incentivos e as palavras de força nos momentos mais turbulentos.

À Dra. Marilene Porawski Garrido, amiga e professora (minha primeira orientadora de iniciação científica), agradeço pela permanente ajuda, pela disponibilidade e pelo mais importante: a amizade.

Aos meus amigos da vida – em especial à “turma de velhos” -, agradeço pela oportunidade de, com eles, desfrutar os melhores momentos da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu não acreditava.

Aos meus familiares, os de longe e os de perto, que, mesmo sem entenderem muito do meu trabalho, muito me incentivaram, agradeço por me apoiarem em todas as fases da minha vida.

À Silvia Bona (sempre pronta a me ajudar), com quem eu pude contar desde os tempos da faculdade, minha querida amiga, um exemplo de vida e de persistência, meu carinho e reconhecimento.

À Lidiane Filippin, Cintia de David e a Rafael Vercelino, três colegas que se tornam grandes amigos, agradeço pela amizade verdadeira, pelas palavras de apoio e pela ajuda constante em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Hepatologia Experimental – Fisiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Estresse Oxidativo da ULBRA, em especial, ao Dr. Nélson Kretzmann Filho (grande ajuda em momento de sufoco), ao Dr. Alexandre Simões Dias e ao Dr. Henrique Fillmann (obrigada pelas traduções), agradeço a importante presença e apoio. A Camila Marques, Luis Forgiarini, Felipe Forgiarini, Darlan Pase da Rosa, Fábio Di Naso, Juliana Tieppo, Éder Marcolin, Dra. Isabel Morgam Martins, Simone Jacques,

Francielli Licks, Renata Minuzzi e Renata Ferrari, agradeço o carinho, a ajuda e a dedicação em algum momento desse trabalho.

Aos profissionais do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial, à secretaria, à Unidade de Experimentação Animal e ao GPPG, meu carinho e reconhecimento.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	15
1 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1 Diabetes Mellitus.....	17
1.1.1 <i>Diabetes Experimental Induzido Quimicamente.....</i>	20
1.2 Estresse Oxidativo.....	21
1.2.1 <i>Estresse Oxidativo no Diabetes Mellitus.....</i>	26
1.3 Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF-κB).....	26
1.4 Croton cajucara BENTH.....	29
2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
4 ARTIGOS EM INGLÊS.....	45
4.1 Carta de Aceite.....	45
4.2 Artigo 1.....	46
4.3 Artigo 2.....	62
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA	Ácido acetil aleurítólico
a.C	Antes de Cristo
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina Difosfato
AGES	Produtos da Glicosilação Avançada
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CcB	<i>Croton cajucara</i> BENTH
Cl ⁻	Cloro atômico
Cm	Centímetro
Cl ₂	Gás cloro
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CO	Controle
CO5D	Controle 5 dias
CO20D	Controle 20 dias
CO ₃ ²⁻	Carbonato
CTN	Trans-crotonina
Cu ⁺	Cobre
DAG	Diacilglicerol
d.C	Depois de Cristo
DCTN	Trans-dehidrocrotonina
DM	Diabetes Mellitus
DM5D	Diabetes Mellitus 5 dias
DM20D	Diabetes Mellitus 20 dias
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
FA	Fosfatase alcalina
Fe ²⁺	Íon ferroso
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa
GAPDH	Gliceraldeído- 3- fosfato desidrogenase
GLUT-2	Transportadores de glicose 2
GPx	Glutatona peroxidase
GSH	Glutatona reduzida
GSSH	Glutatona oxidada
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HOCl	Ácido Hipocloroso
HNO ₂	Ácido Nitroso
IL1-β	Interleucina 1 Beta
IκBα	Inibidor alfa Kappa B
IκBβ	Inibidor beta Kappa B

I κ B γ ,	Inibidor gama Kappa B
I κ B ε ,	Inibidor epson kappa B
IKK	Inibidor kappa quinase
IKK α	Inibidor kappa quinase alfa
IKK β	Inibidor kappa quinase beta
IKK $\beta\gamma$	Inibidor kappa quinase gama
KDa	Quilodaltons
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondealdeído
NAD	Nicotinamida-adenina dinucleotideo
NADPH	Fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo
N ₂ O ₃	Trióxido dinitrogênio
N ₂ O ₄	Tetraóxido dinitrogênio
NF- κ B	Fator de Transcrição Nuclear Kappa B
NO ⁺	Cátion nitrosila
NO ⁻	Ânion nitrosila
NO	Óxido nitrico
NO ₂ ⁻	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ Cl	Nitro-cloro-benzeno
O ₂	Oxigênio
¹ O ₂	Oxigênio singlet
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
PARP	Poli ADP-ribose polimerase
PKC	Proteína quinase C
p50	Subunidade do NF- κ B
p52	Subunidade do NF- κ B
p65	Subunidade do NF- κ B
4- HNE	4- Hidroxynonenal
QL	Quimiluminescência
RAGES	Receptores de AGE
RL	Radical livre
RO ₂ [•]	Peroxila
RO [•]	Alcoxila
ROOH	Peróxidos orgânicos
ROONO	Alquil Peroxinitrito
SOD	Superóxido Dismutase
STZ	Estrepzotocina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....	20
Figura 2	Atuação da STZ nas células β -pancreáticas.....	21
Figura 3	Reações pró-oxidantes-antioxidantes relevantes no sistema biológico.....	24
Figura 4	Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO.....	25
Figura 5	Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia.....	29
Figura 6a	Vista geral da planta <i>Croton Cajucara</i> BENTH em seu ambiente natural.....	30
Figura 6b	Folha do <i>Croton Cajucara</i> BENTH.....	30
Figura 6c	Casca do caule do <i>Croton Cajucara</i> BENTH.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espécies reativas importantes no sistema biológico.....	23
-----------------	---	----

RESUMO

A utilização de plantas com fins medicinais, para o tratamento, a cura e a prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. A espécie *Croton cajucara* BENTH (CcB) é uma planta nativa e endêmica da região Amazônica, onde é popularmente conhecida como “sacaca”. É muito utilizada na medicina popular, sob a forma de chás da casca e de folhas no tratamento de diversas doenças, como o diabetes. Estudos experimentais e clínicos sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese e na progressão do diabetes. Este estudo tem como objetivos avaliar os efeitos do extrato aquoso da casca do CcB sobre as alterações hepáticas, os níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos (TG) e colesterol, os efeitos genotóxicos, o estresse oxidativo, a concentração de nitritos e nitratos e a ativação da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear Kappa B em fígado de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). Foram utilizados ratos machos *Wistar*, divididos em seis grupos com dez animais cada: controle (CO); controle com tratamento durante cinco dias com CcB (CcB5D); controle com tratamento durante 20 dias com CcB (CcB20D); diabéticos (DM); diabéticos com tratamento durante cinco dias com CcB (DM5D); e diabéticos com tratamento durante 20 dias com CcB (DM20D). O DM foi induzido por administração intraperitoneal de STZ na dose de 70mg/Kg. O extrato aquoso (EA) foi preparado com 5g da casca do CcB/100mL H₂O e administrado na dose de 1,5mL intragástrica. Após 60 dias, foi coletado sangue do plexo retro-orbital para as análises das enzimas séricas: AST, ALT, FA e dosagem de glicemia, triglicerídeos e colesterol. Para avaliar a atividade genotóxica do extrato, foi utilizado o teste de micronúcleos (MN) em medula óssea. O homogeneizado do fígado foi utilizado para avaliação de lipoperoxidação (LPO) através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GSH, avaliação dos metabólitos do óxido nítrico (nitritos e nitratos totais) e a expressão nuclear da subunidade p65 do NF-κB. A análise das enzimas séricas mostrou que houve aumento de ALT e FA nos animais DM em relação aos grupos CO, e que a ALT apresentou-se diminuída nos animais DM tratados durante cinco e 20 dias. O tratamento com CcB não diminuiu os níveis da glicemia e do colesterol, houve, porém, redução significativa nos níveis de TG nos animais diabéticos tratados durante cinco e 20 dias. O EA do CcB mostrou-se destituído de ação genotóxica. Houve aumento no TBARS e na SOD em animais DM e diminuição significativa nos animais diabéticos tratados durante cinco e 20 dias. Por outro lado, verificou-se aumento de TBARS e da atividade da SOD no grupo CO20D. A atividade da CAT e da GPx não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados. A GSH apresentou-se diminuída nos animais diabéticos em relação aos controles e ao grupo DM5D. Os animais diabéticos apresentaram aumento nos níveis dos metabólitos do óxido nítrico em relação aos animais controles, e a administração do EA do CcB não reverteu essa situação. Houve ativação da expressão nuclear do p65 nos animais diabéticos que foi atenuada nos animais que receberam o EA do CcB. O tratamento dos ratos diabéticos com o EA de CcB parece melhorar os níveis de TG, não reduziu, no entanto, a glicemia e o colesterol, provavelmente por se tratar de um modelo de diabetes crônico. O tratamento diminuiu a LPO e a atividade da SOD, provavelmente devido à atividade antioxidante do EA do CcB como varredor de radicais ânion superóxido. Os resultados mostram que, em situações onde não há estresse oxidativo, o uso prolongado de

CcB comporta-se como pró-oxidante e, em situações onde existe estresse oxidativo, o tratamento com o CcB pode possuir ação antioxidante varredora de radicais livres. Além disso, os resultados parecem sustentar a hipótese de que o estresse oxidativo presente do DM estimula a expressão do NF- κ B e que administração do EA do CcB reduz essa expressão.

ABSTRACT

The use of plants for medical purposes in the treatment, cure and prevention of diseases is one of the oldest medical practices of mankind. *Croton cajucara* BENTH (CcB) is a vegetal species that is native and endemic in the Amazonian region, where it is popularly known as "sacaca". Bark and leaf infusions of sacaca are widely used in folk medicine to treat many diseases, such as diabetes. Experimental and clinical studies suggest that oxidative stress is involved in the pathogenesis and progress of diabetes. The present study was designed to evaluate the effects CcB aqueous extracts (AE) on hepatic changes, plasma levels of glucose, triglycerides (TG) and cholesterol, genotoxic effects, oxidative stress, nitrites and nitrates levels, and on activation of the p65 subunit of nuclear Kappa B transcription factor (NF- κ B) in the livers of animals made diabetic by streptozotocin (STZ) administration. Six groups of 10 male *Wistar* rats each were used as follows: controls (CO); controls with 5-day treatment with CcB (CcB5D); controls with 20-day treatment with CcB (CcB20D); diabetics (DM); diabetics with 5-day treatment with CcB (DM5D); and diabetics with 20-day treatment with CcB (DM20D). DM was induced by intraperitoneal administration of STZ (70mg/Kg). The aqueous extract was obtained using 5g of CcB bark for 100ml H₂O and intragastrically administered at a dose of 1.5mL. After 60 days retro orbital blood samples were obtained for analysis of serum enzymes AST, ALT, FA and glucose, triglyceride and cholesterol levels determination. The genotoxic activity was evaluated using the micronucleus assay (MN) in bone marrow. The liver homogenates were used for evaluation of lipoperoxidation (LPO) through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), antioxidant enzymes SOD, CAT, GPx and GSH, nitric oxide metabolites (total nitrites and nitrates) and nuclear expression of p65 of NF- κ B. The analysis of serum enzymes showed that there was an increase in ALT and AP in DM animals as compared to CO groups, and ALT was decreased in DM animals treated for 5 and 20 days. The treatment with CcB did not reduce the glycemia and cholesterol level, but there was a significant reduction in the TG levels in DM animals treated for 5 and 20 days. The CcB aqueous extract failed to show any genotoxic action. TBARS and SOD were increased in DM animals and significantly decreased in diabetic animals treated for 5 and 20 days. On the other hand, TBARS and SOD activity were increased in the CcB20D group. CAT and GPx activities were not significantly different across the studied groups. GSH was decreased in the diabetic animals as compared to controls and the DM5D group. The diabetic animals presented an increase in the metabolite levels of nitric oxide as compared to controls, and the administration of CcB AE failed to reverse this situation. There was activation of p65 nuclear expression in the diabetic animals, which was attenuated in the animals receiving the CcB AE. The treatment of diabetic rats with CcB appears to improve TG levels, but it did not reduce glycemia and cholesterol levels, probably because the study dealt with a chronic diabetes model. The treatment decreased LPO and SOD activity, probably because of CcB's antioxidant activity as scavenger of superoxide anion radicals. The results show that in situations where there is no oxidative stress the extended use of CcB behaves acts as a pro-oxidant and in situations where there is oxidative stress the treatment with CcB may be an antioxidant scavenger of free radicals. Furthermore, the results seem to support the hypothesis that the oxidative stress seen in DM stimulates NF- κ B expression and that CcB AE administration reduces such expression.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado aumento na prevalência do Diabetes Mellitus (DM). Desse modo, configura-se uma epidemia mundial que se torna um grande desafio para os sistemas de saúde.

O DM é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou em ambos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

O Estresse Oxidativo (EO) é um mecanismo provável para o desenvolvimento das complicações causadas pelo DM. O EO é o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização do controle redox e/ ou a um dano celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; JONES, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os extratos de plantas, praticamente todas as que contêm bioflavonoides, apresentam significativa ação antioxidante, capaz de diminuir os efeitos nocivos gerados por radicais livres (RL) e, consequentemente, o surgimento das doenças associadas a eles.

Antioxidantes naturais, contidos nas plantas que fazem parte da dieta alimentar, bem como em outras plantas, são conhecidos por prevenir danos oxidativos induzidos por espécies reativas de oxigênio (ERO) e RL. Assim, são considerados importantes na prevenção de doenças (RICHTER et al., 2002).

Plantas com poder antioxidante têm sido utilizadas experimentalmente para tratar os sintomas do DM (VENKATESWARAN e PARI, 2002; SABU e KUTTAN, 2002; VIJAYAKUMAR et al., 2006; KHALIL et al., 2008; TALEB-SENOUCI et al., 2009).

A espécie *Croton cajucara* BENTH (CcB) é espécie medicinal nativa da região Amazônica do Brasil, onde é comumente conhecida como ‘Sacaca’, e, segundo alguns autores, representa um recurso terapêutico eficaz no tratamento e cura de várias doenças (DI STASI et al., 1989; VAN DEN BERG, 1982; COSTA et al., 2007). As folhas e cascas do caule dessa planta são utilizadas pela população

do estado do Pará, na forma de chá ou de pílulas, para o tratamento do DM, diarreia, malária, febre, distúrbios gastrintestinais, renais e hepáticos e no controle de índices elevados de colesterol (VAN DEN BERG, 1982; DI STASI, 1989; DI STASI et al., 1994; MARTINS, 1989).

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da administração do extrato aquoso da casca do CcB sobre parâmetros oxidativos, bioquímicos e moleculares em ratos diabéticos. A dissertação será apresentada em seções. Após a seção de introdução, será apresentada a revisão da literatura (1). Posteriormente, serão apresentados os objetivos do estudo (geral e específicos) e as referências bibliográficas utilizadas na revisão da literatura, seção 2 e 3, respectivamente.

Na quarta seção, serão apresentados dois artigos científicos. O primeiro artigo intitulado: “**Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats**” foi aceito para publicação na revista Arquivos de Gastroenterologia. O segundo artigo intitulado: “**Antioxidant effect and the expression of NF-κB of *Croton Cajucara* BENTH aqueous extract in liver of streptozotocin-induced diabetic rats**” foi submetido à publicação na revista Phytomedicine.

Este trabalho contou com o auxílio financeiro do FIPE/HCPA (Fundo de Incentivo à Pesquisa /Hospital de Clínicas de Porto Alegre) e CAPES. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCPA, sob o número 07-294

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diabetes Mellitus

Os primeiros relatos dessa doença foram registrados pelos antigos egípcios por volta 1500 a.C. Entre os hebreus há relatos com suspeita da ocorrência do diabetes gestacional. Algumas complicações do DM como polifagia, polidipsia, poliúria e poliastenia foram observados pelo médico Areteu da Capadócia, por volta de 70 d.C (OLIVEIRA, 2002).

Pelo período de 1600 anos, a medicina não evoluiu no estudo do diabetes. Só em 1670, o médico inglês Thomas Willis descobriu, provando a urina de indivíduos que apresentavam os mesmos sintomas, que ela era "muitíssimo doce, cheia de açúcar". Em 1815, o químico Michael Chevreul demonstrou que o açúcar dos diabéticos era glicose, embora a causa desse excesso não tivesse sido estabelecida. Por essa razão, os médicos passaram a provar a urina das pessoas sob suspeita de diabetes. Desde essa época, a doença passou a chamar-se "diabetes açucarada" ou "Diabetes Mellitus". A palavra "Mellitus" é latina e quer dizer "mel ou adocicado" (OLIVEIRA, 2002; KING e RUBIN, 2003).

Em 1889, Joseph Von Mering e Oscar Minkowski descobriram que o pâncreas produz uma substância, capaz de controlar o açúcar no sangue e evitar os sintomas do diabetes. Essa substância, anos depois, foi descrita como insulina (OLIVEIRA 2002).

O DM não é uma doença única, mas apresenta um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos. Em comum a todos eles está a hiperglicemia (DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007).

Atualmente, a classificação do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, como até poucos anos. A classificação proposta pela OMS (Organização Mundial de Saúde) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 e DM tipo 2 (essas representam as principais categorias), outros tipos específicos de DM e DM gestacional.

O DM tipo 1, forma presente em 5% a 10% do total dos casos, resulta da destruição das células β -pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Muitas

vezes, essa destruição é mediada por autoimunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo autoimune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM tipo 1 (DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2007). O DM tipo 2 compreende 85% a 90% do total de casos de diabetes. Esse tipo apresenta graus variáveis de resistência tecidual à insulina, relativa deficiência na secreção desse hormônio pelas células β -pancreáticas, além de fatores genéticos, ambientais e obesidade. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2007).

Uma epidemia de DM está em curso. Estima-se que o número de pessoas com DM aumente de 170 milhões, em 2000, para 194 milhões em 2003 e 334 milhões em 2030 (WILD et al., 2004). No Brasil, um censo realizado pelo Ministério da Saúde e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o apoio da Sociedade Brasileira de Diabetes, demonstrou a prevalência de diabetes de 7,6% na população entre 30 e 69 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

No Brasil, existem aproximadamente 11 milhões de diabéticos, compreendendo cerca de 5,9% da população total. Desse universo, 10% delas são portadoras de diabetes do tipo 1 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Existem quatro vias metabólicas que explicam como a hiperglicemia resulta nas complicações diabéticas. São elas: aumento no fluxo da via dos poliois, aumento na formação de produtos finais da glicosilação avançada (AGEs), ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento na atividade da via da hexosamina (BROWNLEE, 2001).

A hiperglicemia também é a causa principal de aumento na geração do ânion radical superóxido. O estresse oxidativo é aceito como principal fator desencadeante no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (BROWNLEE, 2001).

A hiperglicemia permite a conversão de glicose em sorbitol pela via dos poliois, juntamente com a diminuição de fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e glutationa reduzida (GSH). Posteriormente, o sorbitol é metabolizado à frutose pela sorbital desidrogenase e, dessa forma, aumenta a razão NADH/NAD⁺, o que aumentaria a síntese "de novo" de diacilglicerol (DAG), principal ativador fisiológico da PKC (DARLEY-USMAR et al., 1995).

As complicações do DM apresentam origem multifatorial, porém o processo bioquímico de glicosilação avançada é acelerado devido à hiperglicemia crônica e ao estresse oxidativo. A glicosilação avançada envolve a geração de um grupo heterogêneo de substâncias químicas conhecidas como AGEs. Seus efeitos no diabetes podem ser classificados como independentes ou dependentes de receptores, podendo atuar de maneira intracelular ou através de ligação com a superfície celular por intermédio de receptores, como o receptor para produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) (GOH E COOPER, 2008). Ao interagir com seu receptor, os AGEs ativam a via de transdução de sinais secundária como a proteína cinase C (PKC). O alvo chave da sinalização dos AGEs é o NF- κ B, que é translocado para o núcleo, ativando a transcrição de numerosas proteínas celulares, incluindo as moléculas de adesão celular-1, E-selectina, endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias (JORAL et al., 1993; SCHIEKOFER et al, 2003; GOLDIN et al., 2006)

A via de biossíntese da hexosamina é uma via adicional do metabolismo da glicose que pode mediar alguns dos efeitos tóxicos da glicose (BROWNLEE, 2001). Devido a esse mecanismo, o aumento da glicose intracelular tem como consequência a metabolização final de frutose-6-fosfato a uridina difosfato-N-acetil glucosamina, resultando em alterações patológicas na expressão gênica, aumentando a produção de citocinas inflamatórias e fatores de transcrição (DU et al, 2000).

O mecanismo que parece ser comum a todas as células lesadas como consequência da hiperglicemia é a produção aumentada de ERO, sendo essa hipótese capaz de unificar todas as vias, como mostrado na **Figura 1**. A hiperglicemia leva ao aumento da PARP (poli ADP-ribose polimerase), enzima envolvida no reparo de danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA) e, consequentemente, à diminuição da GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), responsável pela metabolização final da glicose, ativando todas as vias (BROWNLEE, 2005).

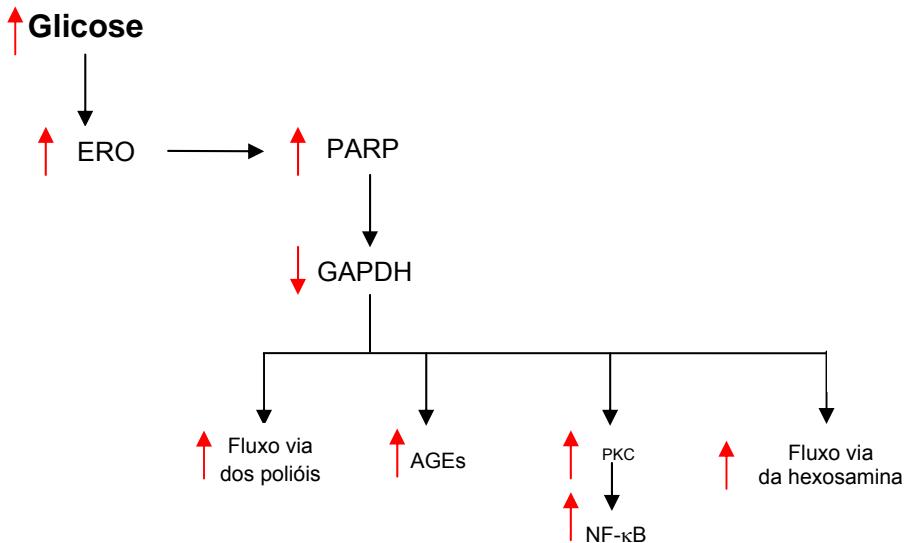


Figura 1: Mecanismo unificado de dano celular induzido pela hiperglicemia (REIS et al., 2008). ERO: espécies reativas de oxigênio; PARP: poli ADP-ribose polimerase; GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); AGEs:produtos finais da glicosilação avançada; PKC: Proteína quinase C; NF-κB: Fator de transcrição Kappa B

1.1.1 Diabetes Experimental Induzido Quimicamente

Grande parte dos conhecimentos científicos que o homem adquiriu na área da biomedicina visando, primordialmente, a saúde humana e a dos animais domésticos foi possível, em grande parte, graças ao uso dos animais de laboratório em suas pesquisas. Esta íntima relação entre pesquisa biomédica e uso de animais de laboratório deve-se, principalmente, ao conhecimento científico adquirido a respeito desses animais (ANDERSEN et al., 2004).

Os modelos experimentais utilizados para o estudo do DM contribuem para o esclarecimento sobre a doença, suas causas e consequências. A indução química do diabetes em animais experimentais ocorre após a destruição química seletiva das células β -pancreáticas. As substâncias diabetogênicas mais usadas são a estreptozotocina (STZ) e o aloxano. A dose dessas drogas para indução do diabetes depende da espécie do animal e do seu peso (SZKUDELKI, 2001).

A STZ é uma nitrosamina, inicialmente isolada do *Streptomyces achromogenes* (HERR et al., 1960). É uma molécula de glicose com uma cadeia lateral altamente reativa, nitrosurea, que inicia a ação citotóxica (ISLAS-ANDRADE et al., 2000). A molécula de glicose direciona a STZ para as células β -pancreáticas, onde ela se liga ao transportador de membrana GLUT-2. Schnedl e colaboradores demonstraram que a toxicidade da STZ nas células β -pancreáticas é devida à

similaridade da molécula da STZ com a da glicose, permitindo que seja internalizada via transportadores GLUT-2 (SCHNEDL et al., 1994; VERSPOHL, 2002).

A ação celular da STZ envolve a produção de ERO, que são capazes de promover alquilação de bases de DNA em vários níveis, as quais, quando reparadas, causam alterações no metabolismo das células β pancreáticas, acarretando depleção de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NAD), conforme ilustrado na Figura 2 (ASPLUND et al., 1984). Evidências apontam para o envolvimento do óxido nítrico (NO) na lesão da célula β -pancreática durante o diabetes induzido por STZ (HALUZIK e NEDVIDKOVA, 2000).

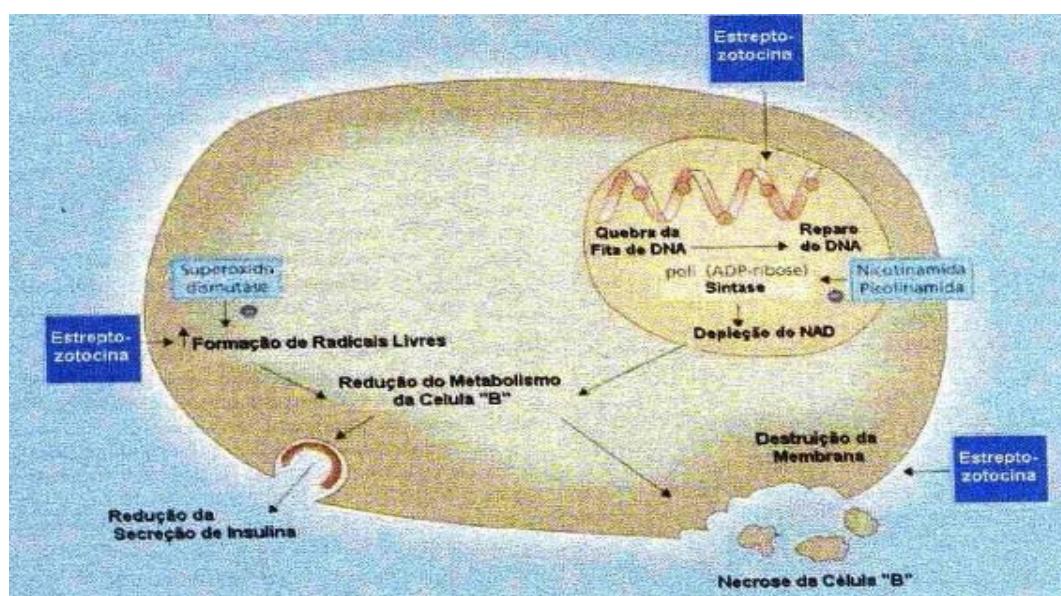


Figura 2. Atuação da STZ nas células β pancreáticas (produtoras de insulina) Adaptado de Pickup e Williams, 1988. DNA: ácido desoxirribonucléico; NAD: nicotinamida-adenina dinucleotídeo

1.2 Estresse Oxidativo

O EO é definido como um desequilíbrio entre as substâncias oxidantes e as defesas antioxidantes, a favor dos oxidantes (SIES, 1993). Um importante aspecto do EO indica que a perda da sinalização óxido-redução é, às vezes, mais importante que o desequilíbrio pró-oxidante/antioxidante ou do dano tecidual induzido pelo desequilíbrio (JONES, 2006). As consequências do EO podem ser muito sutis ou muito agressivas, incluindo dano oxidativo às biomoléculas, interrupção do sinal de transdução, mutação e morte celular e isso depende do balanço entre a geração das espécies reativas formadas e das defesas antioxidantes presentes nas células (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

As espécies reativas mais relevantes na biologia e na medicina são as de oxigênio, de nitrogênio e do cloro. Espécies reativas podem ser ou não um RL, que é qualquer espécie química (átomo, molécula) capaz de existência independente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em qualquer orbital, normalmente no orbital mais externo. ERO é um termo coletivo que inclui os radicais do oxigênio e não radicais que são agentes oxidantes e/ou são facilmente convertidos em radicais (DEL MAESTRO, 1980; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; SOUTHORN, 1988; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Dentre as espécies reativas, o RL ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é de grande importância por ser a primeira ERO gerada nas células. Várias outras espécies reativas de significado fisiológico são derivadas dele como produtos de uma reação em cascata (MUNZEL et al., 2002), incluindo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), este é derivado da reação entre o radical superóxido com o óxido nítrico. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser produzido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, por NADPH oxidase, xantina oxidase, ciclooxygenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase e citocromo P450 (SCHNACHENBERG, 2002). A Tabela 1 mostra espécies reativas importantes no sistema biológico.

Tabela 1- Importantes espécies reativas no sistema biológico (adaptado de HALLIWELL, 2006)

Radicais Livres	Não-radicalis
Espécies Reativas de Oxigênio	Peróxido de hidrogênio, H_2O_2 Oxigênio singlet, ${}^1\text{O}_2$ Peróxidos orgânicos, ROOH
Superóxido, $\text{O}_2^{\cdot-}$ Hidroxila, $\text{OH}^{\cdot-}$ Peroxila, RO_2^{\cdot} Alcoxila, RO^{\cdot} Carbonato, CO_3^{2-}	
Espécies Reativas de Cloro	Ácido hipocloroso, HOCl Gás cloro, Cl_2 Nitro-cloro-benzeno, NO_2Cl
Espécies Reativas de Nitrogênio	Ácido nitroso, HNO_2 Cátion nitrosila, NO^+ Ânion nitrosila, NO^- Tetraoxido dinitrogênio, N_2O_4 Trióxido dinitrogênio, N_2O_3 Peroxinitrito, ONOO^- Ácido Peroxinitroso, ONOOH Alquil Peroxinitrito, ROONO

As ERO participam de várias funções fisiológicas e são parte integrante na defesa contra micro-organismos invasores. Elas são produzidas durante o metabolismo celular aeróbico normal e têm papel importante na manutenção do estado celular redox (SURH, 2005; OKTYABRSKY e SMIRNOVA, 2007).

As espécies reativas nem sempre são prejudiciais. Elas ajudam os fagócitos a eliminarem micro-organismos e a regularem eventos sinalizadores pela via redox e assim influenciar na fosforilação e desfosforilação de enzimas e fatores de transcrição (HALLIWELL, 2006). Algumas reações pró-oxidantes-antioxidantes foram resumidas na **Figura 3**.

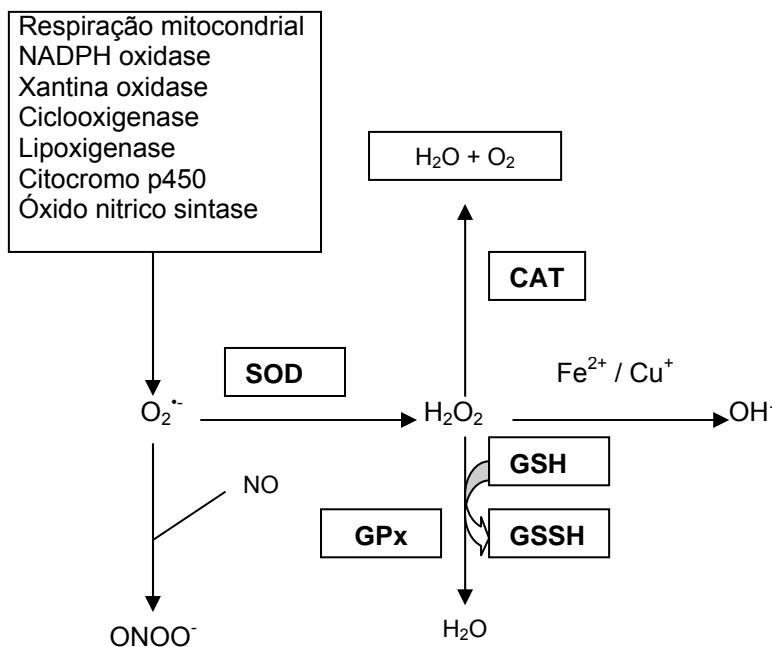


Figura 3: Reações pró-oxidantes/antioxidantes relevantes no sistema biológico. Adaptado de Schnachenberg, 2002. $O_2^{\cdot-}$: ânion superóxido; $ONOO^-$: peroxinitrito; NO: óxido nítrico; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; OH^- : radical hidroxila; H_2O : água; O_2 : oxigênio; H_2O_2 : peróxido de nitrogênio; GPx: glutationa peroxidase; GSH: glutationa reduzida; GSSH: glutationa oxidada; Fe^{2+} : ion ferroso; Cu^+ : cobre; OH^- : hidroxila

Quando um RL reage com um composto não radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, as reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. São efeitos gerais da peroxidação lipídica: diminuição da fluidez da membrana, dano das proteínas de membrana, desarranjos e inativação de receptores, de enzimas, de canais de íons e potenciação da lise celular (HALLIWELL, 2006).

O processo de LPO termina quando dois radicais peroxil reagem entre si, formam um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet (1O_2) e a carbonilas excitadas que retornam ao seu estado fundamental, emitindo quantas de luz visível (RUSSEL, 1957). Podem ser medidas pelo processo de quimiluminescência (QL) e constituem-se num importante método de quantificação de LPO (CASTRO et al., 1990). Outros lipídios hidroperóxidos também se decompõem numa reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxynonenal (4-HNE), hidrocarbonetos voláteis (como o gás etano e pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; LIMA e ABDALLA, 2001).

Como citado anteriormente, o MDA é produto secundário da peroxidação lipídica por via enzimática, derivado da β -ruptura de ácidos graxos poli-insaturados, tais como ácido linoleico, araquidônico e docosahexanoico.

O desequilíbrio no estado redox tem efeitos potencialmente deletérios sobre a biologia celular. Por isso, existem vários mecanismos antioxidantes envolvidos na proteção das células e organismos para um eventual dano causado por quantidades excessivas desses mediadores altamente reativos (SONEJA et al., 2005; BLAIR, 2006).

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato. Os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos ou não enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Entre as principais defesas antioxidantes enzimáticas (**Figura 4**) estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), responsáveis pela dismutação do O_2^- , a catalase (CAT), responsável pela dismutação do H_2O_2 e glutationa peroxidase (GPx). A GPx degrada, além do H_2O_2 , outros peróxidos (DROGE, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

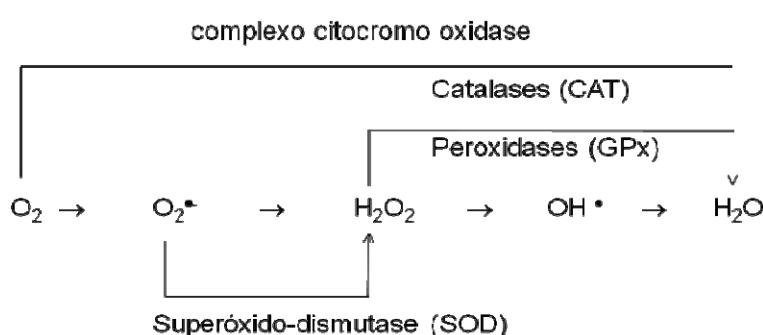


Figura 4: Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (DEL MAESTRO, 1980 Adaptado por MORGAN-MARTINS, 1997). CAT: catalase; GPx: glutationa peroxidase; O₂: oxigênio; O₂[•]: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de nitrogênio; OH[•]: radical hidroxila; H₂O: água; SOD: superóxido dismutase;

Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas da célula estão as vitaminas C e E, os carotenoides, os flavonoides e a glutationa. A glutationa é considerada o antioxidante não enzimático hidrossolúvel mais importante por

participar de inúmeras reações de óxido-redução (BLAIR, 2006; OKTYABRSKY e SMIRNOVA, 2007).

1.2.1 Estresse Oxidativo no Diabetes Mellitus

A hiperglicemia ativa um mecanismo comum às quatro vias metabólicas anteriormente descritas através do aumento na produção do O_2^- pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O EO é aceito como fator chave na mediação do desenvolvimento e progressão do diabetes e de suas complicações (NISHIKAWA et al., 2000; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002; EVANS et al., 2003; CERIELLO, 2003; MARITIM et al., 2003).

A hiperglicemia induz a aumento nos doadores de elétrons (NADH e $FADH_2$) e aumenta o fluxo de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial. Consequentemente, ocorre aumento na relação ATP/ADP e hiperpolarização no potencial de membrana mitocondrial. Esta alta diferença de potencial eletroquímico gerada pelo gradiente de prótons leva a uma inibição parcial no complexo III do transporte de elétrons, resultando no acúmulo de elétrons na coenzima Q. Isto levaria a uma redução parcial na formação de O_2 e à geração do RL O_2^- (KORSHUNOV et al., 1997).

As ERO estariam aumentadas e seriam as principais responsáveis pelas alterações fisiopatológicas do DM (CERIELLO et al., 2003). Moléculas com elétrons desemparelhados, gerados a partir da hiperglicemia, podem reagir com o NO, que é um dos maiores sinalizadores biológicos em nosso organismo, e formar espécies reativas de nitrogênio (SQUADRITO e PRYOR, 1995).

1.3 Fator de Transcrição Nuclear Kappa B (NF-κB)

O NF-κB é fator da transcrição que desempenha um importante e determinante papel, tanto em situações normais como na coordenação de respostas imunes adaptáveis, regulando a expressão de muitos mediadores celulares (ZINGARELLI et al., 2003).

Este fator foi descrito primeiramente em 1986 por Sen e Baltimore, sendo capaz de ligar-se a sítios específicos kappa no *enhancer* das imunoglobulinas em células B (SEN e BALTIMORE, 1986). Está bem estabelecido que NF-κB está

expresso na maioria dos tipos celulares, sendo constituído por um dímero composto dos membros da família da Rel.

A família do NF-κB/Rel compreende cinco subunidades, chamadas p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, e RelB. Tais subunidades formam homodímeros e heterodímeros em várias combinações. Geralmente, o NF-κB consiste em dois polipeptídeos: um de 50 kDa (p50) e um de 65 kDa (p65). Em células em homeostase, o NF-κB mantém-se no citoplasma em sua forma inativa, associado com as proteínas inibidoras do sítio kB, chamadas de inibidores kB (IκB). Sete espécies de IκBs são descritas: IκB α , IκB β , IκB γ , IκB ϵ , Bcl-3, p100, e p105. (ZINGARELLI et al., 2003).

Alterações na regulação do NF-κB estão associadas a diversas doenças crônicas como DM, atherosclerose, artrite reumatoide e asma (BARNES E KARIN, 1997; EVANS et al., 2002; FILIPPIN et al., 2008).

Diversos estudos clínicos foram realizados, utilizando-se de pacientes com DM e avaliando a ativação do NF-κB. O trabalho realizado por Hofmann e colaboradores (1998) avaliou pacientes com DM tipo I que possuíam controle glicêmico insuficiente. Houve maior ativação em células mononucleares sanguíneas periféricas, bem como uma correlação positiva entre a ativação do NF-κB e o EO (HOFMANN, et. al., 1998). Schiekofer e colaboradores (2006) avaliaram pacientes com DM tipo I e concluíram que a normalização dos níveis de glicose sanguínea resulta na redução da ativação do NF-κB.

Trabalhos experimentais também avaliaram a ativação do NF-κB em animais diabéticos. Dias e colaboradores (2005) mostram que animais diabéticos apresentaram aumento na ativação do NF-κB e que, após o tratamento com o antioxidante quercetina, a ativação deste fator diminuiu. Kwon e colaboradores (2006) mostraram que o NF-κB está ativado em camundongos diabéticos induzidos por STZ e que o pré-tratamento com extrato da casca de *Cinnamomum cassia*, chamado de *Cortex cinnamomi* preveniu a ativação do fator de transcrição -κB.

Para ativar o NF-κB, são necessários estímulos intracelulares e ou extracelulares, cujos ativadores podem ser produtos bacterianos (endotoxinas, peptideooglicanos), vírus e componentes virais, protozoários, citocinas (fator de

necrose tumoral [TNF- α], interleucinas), ligação do AGEs com seu receptor RAGE, hiperglicemia, RL e ou oxidantes (ZINGARELLI et al., 2003 VERMA, 2004; AHMED, 2005).

A via intracelular mais investigada atualmente é a existente entre a hiperglicemia e o EO, em que o NF- κ B é o principal envolvido. Este fator regula a expressão de um grande número de genes, incluindo os que possuem grande ligação com as complicações do DM (EVANS et al., 2003)

A ativação do NF- κ B (**Figura 5**) requer a fosforilação de seus inibidores fisiológicos (particularmente o I κ B α) em resíduos específicos de Serina (Ser-32 e Ser-36). Tal fosforilação é mediada por um complexo proteico. O complexo quinase kappa B (IKKs) é composto de três subunidades, duas unidades catalíticas IKK- α , IKK- β , e uma unidade reguladora IKK γ (NF- κ B essential modulator, NEMO). Após a fosforilação, ocorre a subsequente degradação das I κ Bs através das ubiquitininas, formando um proteossoma 26S (YAMAOKA et al., 1998). A degradação proteolítica dos I κ Bs permite a translocação do NF- κ B ao núcleo. No núcleo, o NF- κ B regula a expressão de genes, incluindo fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e RAGE. Muitos produtos dos genes regulados pelo NF- κ B também funcionam como seus próprios ativadores, tal como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF- α , interleucina 1 beta (IL1- β) e RAGE. (DIDONATO et al., 1997; KARIN, 1999).

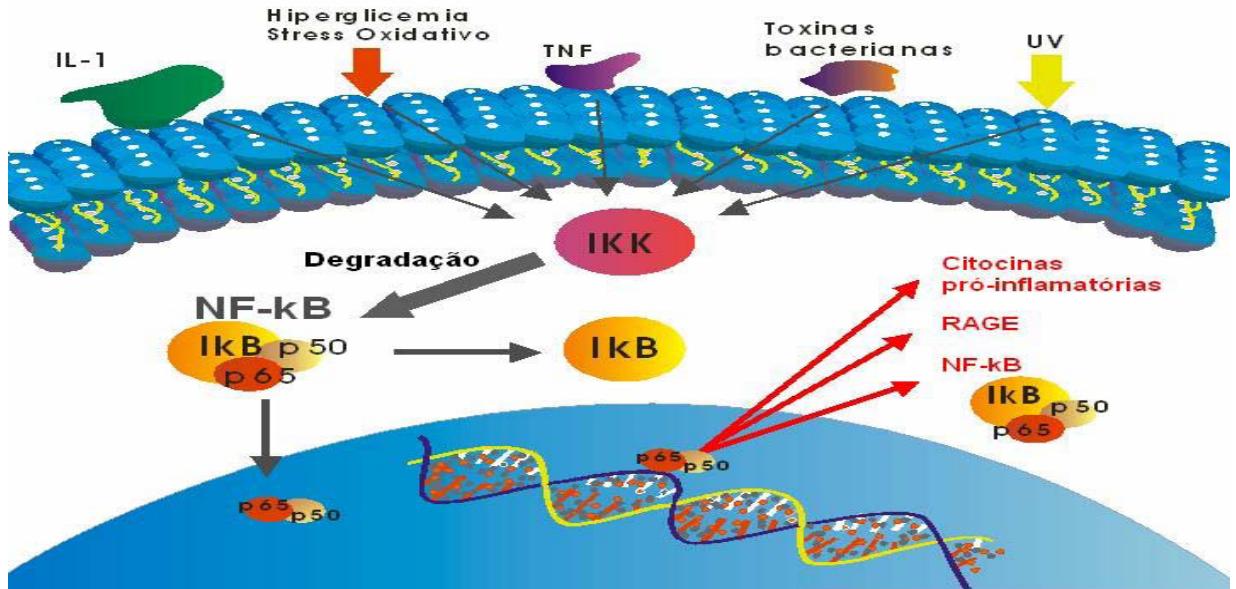


Figura 5: Vias de ativação do NF-κB. Representação esquemática da translocação nuclear da molécula de NF-κB ativada frente diversos estímulos como hiperglicemia, estresse oxidativo, infecção, citocinas e radiação ultravioleta. No núcleo o NF-κB promove a transcrição de diversos moduladores como citocinas pró-inflamatórias e RAGE. IL-1: interleucina 1; TNF: fator de necrose tumoral; UV: raios ultra-violetas; NF-κB: fator transcrição kappa b; IKB: inibidor Kappa B p65: subunidade do NF-κB; p50: subunidade do NF-κB; IKK: inibidor kappa quinase

1.4 *Croton Cajucara* BENTH

As plantas são tradicionalmente utilizadas por populações em todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, sendo reconhecidas mais de 13.000 espécies que são mundialmente consumidas como fármacos ou fonte de fármacos (SIMÕES et al., 2004).

Esse tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares como botânica, farmacologia e fitoquímica que, juntas, enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL et al., 2002a).

A família Euphorbiaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, compreende 313 gêneros, nos quais estão distribuídas, aproximadamente, 8.100 espécies, a maioria cosmopolita, especialmente encontrada em regiões tropicais e subtropicais (MABBERLEY, 1997; HIRUMA-LIMA et al., 2002).

O nome do gênero *Croton*, descrito por Carl Linnaeus, significa "carrapato", pela semelhança das sementes com esse animal. Nesse gênero, ocorrem 750 espécies tropicais, que são abundantes na região amazônica e na Mata Atlântica, sendo algumas árvores, e outras, ervas e arbustos (HIRUMA-LIMA et al., 2002).

Uma das espécies mais conhecidas no Norte do Brasil é o CcB vulgarmente conhecido por Sacaca (termo que, em língua Tupi, corresponde a feitiço) (ABREU et al., 2001).

O CcB, como mostrado na **Figura 6a, 6b e 6c**, cresce em áreas abandonadas ou em clareiras abertas em áreas baixas da floresta. Possui madeira branco-amarelada com cascas aromáticas, folhas inteiras e simples, pecioladas, estipuladas, lanceoladas, peninérveas, verdes com limbos divididos em lobos ou segmentos, inflorescência racemosa, com flores de sexo separado, fruto seco, esquizocárpico, separando-se em três cocos, bem como sementes ricas em endosperma (VAN DEN BERG, 1982; HIRUMA-LIMA et al., 2002).



Figura 6: Vista geral da planta *Croton cajucara* BENTH em seu ambiente natural (a) Vista geral das folhas de *Croton cajucara* BENTH (b) Cascas do caule do *Croton cajucara* BENTH (c) Fonte: MIOTTO AM, 2001 (a,b) LORENZI E MATOS, 2002 (c);

O CcB distribui-se nas regiões Leste e Central da floresta Amazônica, principalmente no Pará, junto ao estuário do Rio Amazonas, como também no estado do Amapá. Já, no próprio estado do Amazonas, só é encontrado em plantações cultivadas (SIMÕES et al., 1995).

Sua inflorescência, em racemos terminais com 9 cm de comprimento, apresenta-se com sete flores femininas na base e 12 masculinas na porção mediana terminal, de cor amarelada. Os frutos são cápsulas globosas, com pouco menos de 1 cm de comprimento, com uma semente preta em cada carpelo. A planta multiplica-se apenas por meio de sementes (LORENZI E MATOS, 2002).

No estado do Pará, as folhas e casca do caule do CcB são utilizadas em forma de chá ou pílula, no combate a diabetes, febre, distúrbios hepáticos, renais e intestinais, hipercolesterolemia. A sacaca também é comercializada em farmácias de

manipulação, e, neste caso, o pó das cascas do caule é vendido em forma de cápsulas. As folhas são comercializadas em feiras livres da cidade de Belém-PA, para distúrbios do fígado e como auxiliar na digestão, principalmente após a ingestão de alimentos gordurosos. O pó das folhas é vendido com indicação hepatoprotetora, tratamento do diabetes e dietas de emagrecimento (MACIEL et al., 1998a; MACIEL et al., 2002a, VEIGA Jr et al., 2005, COSTA, 2007).

Estudos mostraram que as cascas do caule são ricas em diterpenos do tipo clerodano, tendo sido isolados: *trans*-desidrocrotonina (DCTN), *trans*-crotonina (CTN), *cis*-cajucarina B, *trans*-cajucarina B, cajucarina A, cajucarinolida, isocajucarinolida, isosacacarina e o triterpeno ácido acetilaleuritólico (AAA) (MACIEL et al., 1998b; MACIEL et al., 2003).

Dentre os terpenoides isolados, a DCTN foi o componente majoritário isolado (MACIEL et al., 1998a,b) com um rendimento incomum (em se tratando de produto natural) de 1,4%. Este 19-nor-clerodano demonstrou correlação com grande parte das propriedades farmacológicas do *Croton cajucara*, tendo sido comprovadas as seguintes atividades: hipoglicêmica (FARIAS et al., 1997; SILVA et al., 2001a), hipolipidêmica (SILVA et al., 2001a,b,c; BIGHETTI et al., 2004), antigenotóxica (AGNER et al., 1999; AGNER et al., 2001), antiulcerogênica (SOUZA-BRITO et al., 1998; HIRUMA-LIMA et al., 1999; MACIEL et al., 2000; MELO et al., 2003; RODRÍGUEZ et al., 2004), antitumoral (GRYNBERG et al., 1999; MACIEL et al., 2000; MELO et al., 2004), anti-inflamatória e antinociceptiva (CARVALHO et al., 1996; MACIEL et al., 2002b), antiestrogênica (LUNA COSTA et al., 1999) e cardiovascular (SILVA et al., 2005).

Farias e colaboradores demonstram que a administração oral de DCTN é efetiva em reduzir a hiperglicemia. Ratos com DM induzido por aloxano, que receberam diferentes doses de DCTN, por via oral, apresentaram redução dos níveis de glicose (FARIAS et al., 1997). Em ratos diabéticos induzidos pelo uso da STZ, a DCTN demonstrou maior eficácia no pré-tratamento com redução da hiperglicemia de 58,56 e 61% após 2, 48 e 72 horas, respectivamente. A ação hipoglicemiante da DCTN foi semelhante àquela apresentada pela aminoguanidina (inibidor da óxido nítrico sintase com propriedades antioxidantes) (SILVA et al., 2001a).

Atualmente, a partir de modificações químicas da molécula de DCTN estão sendo desenvolvidos estudos com o objetivo de avaliar a relação estrutura/atividade biológica (GRYNBERG et al., 1999; MACIEL et al., 2000; MELO et al., 2001; ANAZETTI et al., 2003; MELO et al., 2003; MELO et al., 2004; ANAZETTI et al., 2004).

A utilização de plantas como meio curativo é atividade altamente difundida e popular. Às vezes, é empregada de maneira equivocada, pois muitas plantas possuem princípios tóxicos e o uso indiscriminado pode causar sérios problemas (LORENZI E MATOS, 2002).

Casos de hepatite tóxica foram notificados em hospitais públicos da região Amazônica devido ao uso prolongado da sacaca (MACIEL et al., 2002a). A relação entre a sacaca e a hepatite é conhecida dos médicos amazônicas há tempos e seus efeitos nocivos foram relatados no Congresso Brasileiro de Hepatologia, em 1999, no Rio de Janeiro.

Segundo o hepatologista Doutor Paulo Cartágenes, do Instituto Evandro Chagas, em Belém, os efeitos da planta começaram a ser percebidos por volta de 1998, quando foram detectados casos de hepatite que não eram causados por nenhum vírus. Surgiu, então, a possibilidade de intoxicação por sacaca. O Dr. Cartágenes foi o coordenador de um estudo sobre "Hepatite por sacaca", apresentado em congresso, envolvendo 25 pacientes com idades que variavam entre 15 e 76 anos. Todos tiveram hepatite. Em outro estudo realizado com ratos de laboratório, também do Instituto Evandro Chagas, e apresentado no mesmo congresso, foram constatados danos ao fígado, provocados pela utilização dessa planta (Cartágenes, 1999).

A disseminação de uso da sacaca tem chegado a lugares distantes, como na cidade de Caxias do Sul, no Rio Grande do Sul, onde houve casos de hepatite fulminante, conforme comunicação pessoal do Doutor Milton Bertelli, médico gastroenterologista e hepatologista.

Tendo em vista as considerações feitas, para melhor compreensão dos efeitos do uso crônico do CcB em fígado de ratos diabéticos, objetivo desse projeto,

seria importante conhecermos melhor seu mecanismo de ação e seu provável potencial terapêutico para uso futuro.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração do extrato aquoso da casca do CcB sobre parâmetros oxidativos, bioquímicos e moleculares em fígado de ratos diabéticos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do CcB sobre

- os níveis de glicemia, colesterol e triglicerídeos;
- a integridade hepática através de medidas de concentração sérica de transaminases aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e da fosfatase alcalina (FA);
- o dano no DNA através do teste de micronúcleos na medula dos diferentes grupos estudados;
- a LPO mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx no tecido hepático dos diferentes grupos estudados;
- os níveis de GSH no tecido hepático dos diferentes estudados;
- a expressão nuclear da subunidade p65 do NF-κB.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU AS, BARBOSA OS, MULLER AH, GUILHON GMSP 2001. Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA 1: 1.(<http://www.ufpa.br/revistaic>).

AGNER AR, MACIEL MAM, PINTO AC, PAMPLONA SGSR, CÓLUS IMS. Investigation of genotoxic activity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis**. v.19, p. 377-384, 1999.

AGNER AR, MACIEL MAM, PINTO AC, CÓLUS IMS. Antigenotoxicity of trans-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**. v. 67, p. 815-819, 2001.

AHMED N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.67(1), p.3-21, 2005.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care for diabetes. **Diabetes Care**, v. 17, p. 1514-1522, 2007.

ANAZETTI MC, MELO PS, DURÁN N, HAUN M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.

ANAZETTI MC, MELO PS, DURÁN N, HAUN M. Dehydrocrotonin and its derivative, dimethylamide-crotonin induce apoptosis with lipid peroxidation and activation of caspases-2, -6 and -9 in human leukemic cells HL60. **Toxicology**, v. 203, p. 123-137, 2004.

ANDERSEN ML, D'ALMEIDA V, KO MI G, KAWAKAMI R, MARTINS PJF, MAGALHÃES LE, TUFIK S. Princípios Éticos e Práticos do uso de animais de experimentação. 1. ed. São Paulo: Unifesp, 2004. p.167.

ASPLUND K, GRANKVIST K, MARKLUND S, TALJEDAL IR. Partial protection against Streptozotocin-induced hyperglycaemia by superoxide dismutase linked to polyethylene glycol. **Acta Endocrinologica**, v. 107, p. 390-394, 1984.

BARNES PJ, KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, p.1066-71, 1997.

BETTERS JL, LIRA VA, SOLTOW QA, DRENNING JA, CRISWELL DS. Drenning, and D.S. Criswell. Supplemental nitric oxide augments satellite cell activity on cultured myofibers from aged mice. **Experimental Gerontology**, v.43, p.1094-101, 2008.

BIGHETTI EJB, SOUZA-BRITO ARM, FARIA EC, OLIVEIRA HCF. Chronic treatment with bark infusion from *Croton cajucara* lowers plasma triglyceride levels in genetic hyperlipidemic mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 82, p. 387-392, 2004.

BOSCO A, LARÁRIO AC, SORIANO D; dos SANTOS RF, MASSOTE P, GALVÃO D, FRANCO NA, PURISCH S, FERREIRA AR. Diabetic retinopathy. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, p. 217-227, 2005.

BONNEFONT-ROUSSELOT D. Glucose and reactive oxygen species. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 5, p.561-8, 2002.

BLAIR IA: Endogenous glutathione adducts. **Current Drug Metabolism**, v. 7(8), p. 853-72, 2006.

BRINGOLD U, GHAFOURIFAR P, RITCHER C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca²⁺ release. **Free Radical Biology Medicine**, v. 29, p. 343, 2000.

BROWNLEE M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p.813-20, 2001.

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

BUCHMAN AL,O'BRIEN W, OU CN, ROGNERUD C, ALVAREZ M, DENNIS K, AHN C. The effect of arginine or glycine supplementation on gastrointestinal function, muscle injury, serum amino acid concentrations and performance during a marathon run. **International journal of sports medicine**, v. 20, p.315-21, 1999.

CARTÁGENES PBR, MOREIRA CC, TEIXEIRA AC, SILVEIRA FAA, DIAS-JUNIOR LB, BICHARA CDA, RODRIGUES ALS, BENSABATH G, SOARES MCP. Hepatite por Sacaca (*Croton cajucara* Benth): Epidemiologia clínica em 25 casos. **GED**, v. 18, p.24, 1999.

CARVALHO JCT, SILVA MFC, MACIEL MAM, PINTO AC, NUNES DS, LIMA RM, BASTOS JK, SARTI SJ. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities prototype of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-norclerodane diterpene from *Croton cajucara*. Part 1. **Planta Medica**, v. 62, p. 402-404, 1996.

CASTRO LS, COELHO, ACJ, BOGOSSIAN L, UMBERTO P. Radicais livres de oxigênio. Aspectos químicos, biológicos e fisiopatológicos em medicina. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 59, p.11-21,1990.

CERIELLO A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. **Diabetes Care**, v.26, p. 1589-96, 2003.

COSTA MP, MAGALHÃES NSS, GOMES FES, MACIEL MAM. Uma revisão das atividades biológicas da trans-desidrocrotonina, um produto natural obtido de *Croton cajucara*. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v.17(2), p. 275-286, 2007.

DARLEY-USMAR V, WISEMAN H, HALLIWELL B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Letters**, v.369, p.131-151, 1995.

DEL MAESTRO RF. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta physiologica Scandinavica Supplementum**, v.492, p.153-167, 1980.

DIAS AS, PORAWSKI M, ALONSO M, MARRONI N, COLLADO PS, GONZALEZ-GALLEGOS J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Nutrition**, v. 135 p. 2299-304, 2005.

DIDONATO JA, HAYAKAWA M, ROTHWARP DM, ZANDI E, KARIN M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. **Nature**, v.388 (6642), p. 548-54, 1997.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES.
http://www2.prefeitura.sp.gov.br/arquivos/secretarias/saude/programas/0007/Diretrizes_SBD_2007.pdf Acessado em 2010.

DI STASI LC, SANTOS EMG, SANTOS C M, HIRUMA-LIMA CA. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: UNESP, 1989.127p.

DI STASI LC, HIRUMA CA, GUIMARÃES EM, SANTOS CM 1994. Medicinal plants popularly used in Brazilian Amazon. **Fitoterapia**, v. 65, p.529-540, 1994.

DU XL, EDELSTEIN D, ROSSETTI L, FANTUS IG, GOLDBERG H, ZIYADEH F, WU J, BROWNLEE M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97(22), p. 12222-6, 2000.

DROGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82(1), p. 47-95, 2002.

EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v.23 (5), p.599-622. 2002

EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM. Are oxidative stress – activated signaling pathways mediators of insulin resistance and B cell dysfunction? **Diabetes**, v. 52, p. 1-8, 2003.

FARIAS RAF, RAO VSN, VIANA GSB, SILVEIRA ER, MACIEL MAM, PINTO AC. Hypoglycemic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 63, p.558-560, 1997.

GRIENDLING KK, FITZGERALD, GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. I. Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GRYNBERG NF, ECHEVARRIA A, LIMA JE, PAMPLONA SSR, PINTO AC, MACIEL MAM. Anti-tumour activity of two *nor*-clerodane diterpenes, *trans*-dehydrocrotonin and *trans*-crotonin, from *Croton cajucara*. **Planta Medica**, v. 5, p. 687-689, 1999.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metal and Diseases. **Biochemical Journal**, v. 219, p. 1–14, 1984.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE, JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 2 ed., Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v.142, p. 231-255, 2004.

HALLIWELL B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p.312-322, 2006.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Nova York: Oxford University Press, v.1, 2007. 851p.

HALUZIK M, NEDVIDKOVA J. The role of nitric oxide in the development of streptozotocin-induced diabetes mellitus: experimental and clinical implications. **Physiological Research**. v. 49, p. 37–42, 2000.

HERR RR, EBLE TE, JAHNKE HR. Isolation and carachterization of streptozotocin. **Antibiotics annual**, v.7, p.236-40, 1960.

HIRUMA-LIMA CA, SPADARI-BRATFISCH RC, GRASSI-KASSISSE DM, SOUZA-BRITO ARM. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. **Planta Médica**, v. 65, p. 325-330, 1999.

HIRUMA-LIMA CA, SOUZA-BRITO ARM, GUIMARÃES EM, SANTOS CM, DI STASI LC. Euphorbiales Medicinais. In: DI STASI LC, HIRUMA-LIMA CA. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: UNESP, 2002. p. 236-259.

HOFMANN MA, SCHIEKOFER S, KANITZ M, KLEVESATH MS, LOSWIG M, LEE V, MORCOS M, TRITSCHLER H, ZIEGLER R, WAHL P, BIERHAUS A, NAWROTH PP. Insufficient glycemic control increases nuclear factor κ -B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 8, p. 1310-1316, 1998.

HUO Y, WINTERS WD, YAO DA-LIN. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 48-55, 2003.

IDRIS I, GRAY S, DONNELLY. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. **Diabetologia**, v.44, p.659-73, 2001.

ISLAS-ANDRADE S, MONSALVE CRM DE LE PENA JE, POLANCO AC, PALOMINO MA, VELASCO AF. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. **Acta Histochemica Cyto chemica**. v.33(3), p. 201-208, 2000.

JONES DP. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163(1-2), p. 38-53, 2006.

KARIN M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, p. 6867-74, 1999.

KHALIL NM, PEPATO MT, BRUNETTI IL. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: Bauhinia forficata and Cissus sicyoides. **Biological Research**, v. 41(2), p.165-71, 2008.

KING KM, RUBIN G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. **British Journal of Nursing**, v. 12(18), p. 1091 – 1095, 2003.

KORSHUNOV SS, SKULACHEV VP, STARKOV AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Letters**, v. 416, p. 15-8, 1997.

KWON KB, KIM EK, JEONG ES, LEE YH, LEE YR, PARK JW, RYU DG, PARK BH. Cortex cinnamomi extract prevents streptozotocin- and cytokine-induced beta-cell damage by inhibiting NF-kappaB. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 4331-4337, 2006.

LIMA ES, ABDALLA DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LI WL, ZHENG HC, BUKURU J, De KIMPE N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LORENZI H; MATOS FJA. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Pantarum, 2002. 512p.

LUNA COSTA AM, SILA JCR, CAMPOS AR, RAO VSN, MACIEL MAM, PINTO AC. Antioestrogenic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 689-691, 1999.

MABBERLEY DJ. The plant book. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858p.

MACIEL MAM, PINTO AC, BRADO SN, ARRUDA AC. Estudo da variação dos teores de terpenóides bioativos isolados das cascas do caule de *Croton cajucara*, nativos e cultivados no estado do Pará. **Revista Universidade Rural**, Série Ciências Exatas e da Terra. v. 18/20: 17-34 1998a.

MACIEL MAM, PINTO AC, BRABO SN, SILVA MN. Terpenoids from *Croton cajucara*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 823-828, 1998b.

MACIEL MAM, PINTO AC, ARRUDA AC, PAMPLONA SGSR, VANDERLINDE FA, LAPA AJ, ECHEVARRIA A, GRYNBERG NF, CÓLUS IMS, FARÍAS RAF, COSTA AML, RAO VSN. Ethnopharmacology, phytochesmistry and pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. **Journal Ethnopharmacology**, v.70, p. 41-55, 2000.

MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JR VF, MARTINS JR, GRYNBERG NF, CHEVARRIA A, LAPA AJ, VANDERLINDE FA. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. In: **Phytochem Pharmacol II Ser Recent Prog Med Plants**, v. 8, p. 459-475, 2002a.

MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JR VF. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002b.

MACIEL MAM, PINTO AC, KAISER CR. NMR and structure review of some natural furoclerodanes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p.278-282, 2003.

MAEJIMA K, NAKANO S, HIMENO M, TSUDA S, MAKIISHI H, ITO T, NAKAGAWA A, KIGOSHI T, ISHIBASHI T, NISHIO M, UCHIDA K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in Type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. **Journol of Diabetes and Its Complications**, v.15, p. 135-43, 2001.

MANTILHA MET. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos.Un conepito patogênico para la micro y macroangiopatia diabética. **Revista Cubana de Angiologia y Cirurgia. Vascular**. v. 2, p. 131-41, 2001.

MARLES RJ, FARNSWORTH NR. Antidiabetic plants and their active constituents. **Review Phytomedicine**, v.2, p. 137-189, 1995

MARTINS JEC. **Plantas medicinais de uso na Amazônia**. Centros de estudos jurídicos do Pará, Belém, Brasil. 1989. 92p.

MARITIM AC, SANDERS RA, WATKINS JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal Biochemical Molecular Toxicology**. V.17, p. 24-38, 2003.

MELO PS, DURÁN N, HAUN M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v. 159, p. 135-14, 2001.

MELO PS, DURÁN N, HIRUMA-LIMA CA, SOUZA-BRITO ARM, HAUN M. Comparison of the gastroprotective effect of a diterpene lactone isolated from *Croton cajucara* with its synthetic derivatives. **Journal Ethnopharmacology**, v. 87, p. 169-174, 2003.

MELO PS, JUSTO GZ, DURÁN N, HAUN M. Natural killer cell activity and anti-tumour effects of dehydrocrotonin and its synthetic derivatives. **European Journal of Pharmacology**, v. 487, p. 47-54, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Cadernos de Atenção Básica**. Diabetes Mellitus. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, v. 16, p. 64, 2006.

MIOTTO AM. Perfil lipídico e sensibilidade adrenérgica em átrio direito de ratos normo e hipercolesterolêmicos tratados ou não com infuso das cascas de *Croton cajucara* BENTH. 2001, Universidade Estadual de Campinas: Campinas. p. 73.

MÜNZEL T, AFANAS'EV IB, KLESCHYOV AL, HARRISON DG. Detection of superoxide in vascular tissue. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.22, p.1761-8, 2002.

NEGRI G, Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais e hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p. 121-142, 2005.

NISHIKAWA T, EDELSTEIN D, DU XL, YAMAGISHI SI, MATSUMURA T, KANEDA Y, YOREK MA, BEEBE D, OATES PJ, HAMMES HP, GIARDINO I, BROWNLEE M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, p. 787-90, 2000.

OKTYABRSKY ON, SMIRNOVA GV: Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Mosc)**, v. 72(2), p.132-45, 2007.

OLIVEIRA RF. **Diabetes dia-a-dia**: guia para o diabético, seus familiares, amigos e membros das equipes de saúde. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter. 2002.

PICKUP J, WILLIANS G. **Textbook of diabetes**. 2. ed. Blackwell Scince, 1998. 164p.

RADI R, CASSINA A, HODARA R, QUIJANO C, CASTRO L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Radical Biology Medicine**, v. 33, p. 1451-1460, 2002.

REIS JS, VELOSO CA, MATTOS RT, PURISH S, MACHADO JAN. Estresse Oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo1. **Revista Brasileira de Endocrinologia e Metabolismo**, v.52, p. 1096-1105, 2008.

RICHTER MJ, LIMA MFS, BORDIGNON SAL, SCHWARTSMANN. A flora brasileira e seu potencial antioxidante. In: MARRONI NP. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. 1.ed. Canoas: ULBRA, 2002. p.177-196.

RODRÍGUEZ JA, HIRUMA-LIMA CA, SOUZA-BRITO ARM. Antiulcer activity and subacute toxicity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Human Experimental Toxicology**, v. 23, p. 455-461, 2004.

RUSSEL GA. Deuterium-isotope Effects in the Autoxidation of Aralkyl Hydrocarbons. Mecanism of the Interaction of Peroxy Radicals. **Journal Americam Chemical Society**, v.79, p. 3871-3880, 1957.

SABU MC, KUTTAN R. Antidiabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 155-160, 2002.

SAID O, KHALIL K, FULDER S, AZAIZEH H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal Ethnopharmacology**, v. 83, p. 251-265, 2002.

SHI HP, EFRON DT, MOST D, TANTRY US, BARBUL A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. **Surgery**, v. 128, p.374-8, 2000.

SCHIEKOFER S, GALASSO G, ANDRASSY M, APRAHAMIAN T, SCHNEIDER J, ROCNIK E. Glucose control with insulin results in reduction of NF- κ B-binding activity in mononuclear blood cells of patients with recently manifested type 1 diabetes. **Diabetes, obesity and metabolism**, v.8, p. 473-482, 2006.

SCHNACHENBERG CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease. **Current Opinion Pharmacology**, v. 2, p. 121-125, 2002.

SCHNEDL WJ, FERBER S, JOHNSON JH, NEWGARD CB. STZ transport and cytotoxicity: specific enhancement in GLUT2- expressing cells. **Diabetes**, v. 43, p. 1326-33, 1994.

SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, p. 921–928, 1986.

SIES H, MURPHY ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biolog**, v.8, p. 211-8, 1991.

SILVA RM, SANTOS FA, RAO VSN, MACIEL MAM, PINTO AC. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. **Diabetes Obesity Metabolism**, v. 3, p. 452-456, 2001a.

SILVA RM, SANTOS FA, MACIEL MAM, PINTO AC, RAO VSN. Effect of *trans*-dehydrocrotonin, a 19-nor-clerodane diterpene from *Croton cajucara* on experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia induced by triton WR1339 (tyloxapol) in mice. **Planta Medica**, v. 67, p. 763-765, 2001b

SILVA RM, SANTOS FA, RAO VSN, MACIEL MAM, PINTO AC. The lipid-lowering effect of *trans*-dehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara* Benth. In mice fed on high-fat diet. **Journal Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p.535-539. 2001c.

SILVA RM, OLIVEIRA FA, CUNHA KMA, MAIA JL, MACIEL MAM, PINTO AC, NASCIMENTO NRF, SANTOS FA, RAO VSN. Cardiovascular effects of *trans*-dehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* in rats. **Vascular Pharmacology**, v. 43, p. 11-18, 2005.

SIMÕES JC, SILVA AJR, SERRUYA H, BENTES MHS. Desidrocrotonina, um norditerpeno de *Croton cajucara* BENTH (Euphorbiaceae). **Ciência e Cultura**, v. 31(10), p.1140-1, 1995.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMANN G, MELLO JCP, MENTZ L, PETROVICK PR. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC/Editora UFRGS, 2004.

SOUTHORN P; POWIS G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and biological Reactions. **Mayo Clinic Proceedings**, v.63, p381-389, 1988.

SOUZA-BRITO ARM, RODRÍGUEZ JA, HIRUMA-LIMA CA, HAUN M, NUNES DC. Antiulcerogenic activity of trans-dehydrocrotonin from *Croton cajucara*. **Planta Médica**, v. 64, p. 126-129, 1998.

SONEJA A, DREWS M, MALINSKI T: Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108- 19, 2005.

SPITALER MM, GRAIER WF, Vascular targets off redox signaling in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 45, p. 476-494, 2002.

SQUADRITO GL, PRYOR WA. The formation os peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. **Chemical Biological Interaction**, v. 96, p.203-206, 1995.

STADLER K, JENEI V, VON BOLCSHAZY G, SOMOGYI A, JAKUS J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.35, p. 1240-51, 2003.

SURH YJ: **Oxidative Stress, Inflammation and Health**. Packer L (ed.). Londres: Taylor & Francis, 2005.

SZKUDELSKI T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the Rat pancreas. **Physiology Research**, v. 50, p. 537-46, 2001.

TALEB-SENOUCI D, GHOMARI H, KROUF D, BOUDERBALA S, PROST J, LACAILLE- DUBOIS, BOUCHERNAK M. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueus extract in streptozotocin- induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 16, p. 623-631, 2009.

VAN DEN BERG ME, **Plantas Medicinais na Amazônia- Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático**. Belém: Falangola, 1982. p158.

VEIGA JR VF, PINTO AC, MACIEL MAM, Medicinal plants: Safe cure? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENKATESWARAN S, PARI L. Effect of *Coccinia indica* leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 163-168, 2003.

VERMA IM. Nuclear factor (NF)-kappaB proteins: therapeutic targets. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 63, p. ii57-ii61, 2004.

VERSPOHL EJ. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, v.68, p. 581-590, 2002.

VIJAYAKUMAR M, GOVINDARAJAN R, RAO GMM, RAO CV, SHIRWAIKAR, MEHROTRA, PUSHPANGADAN. Action of *Hygrophila auriculata* against streptozotocin-induced oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p. 356-361, 2006.

VOLPATO GT, DAMASCENO DC, CALDERON IMP, RUDGE MVC. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiente no controle do Diabetes mellitus. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, p.35-45, 2002.

WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27(5), p. 1047-53, 2004.

WILLIAMS JZ, ABUMRAD N, BARBUL A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. **Annals of Surgery**, v. 236, p.369-74, 2002.

YAMAOKA S, COURTOIS G, BESSIA C, WHITESIDE ST, WEIL R, AGOU F, KIRK HE, KAY RJ, ISRAEL A. COMPLEMENTATION cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. **Cell**, v. 93 (7), p. 1231-1240, 1998.

ZINGARELLI B, SHEEHAN M, WONG HR. Nuclear factor- κ B as a therapeutic target in critical care medicine. **Critical Care Medicine**, v. 31, p. S105–S111, 2003.

4 ARTIGOS EM INGLÊS

4.1 Carta de Aceite

ARQUIVOS de GASTROENTEROLOGIA

- Fundada em 1964 -

Órgão Oficial de:

INSTITUTO BRASILEIRO de ESTUDOS e PESQUISAS de GASTROENTEROLOGIA - IBEPEGE

COLÉGIO BRASILEIRO de CIRURGIA DIGESTIVA - CBCD

**SOCIEDADE BRASILEIRA de MOTILIDADE DIGESTIVA – SBMD
FEDERAÇÃO BRASILEIRA de GASTROENTEROLOGIA – FBG**

SOCIEDADE BRASILEIRA de HEPATOLOGIA – SBH

SOCIEDADE BRASILEIRA de ENDOSCOPIA DIGESTIVA – SOBED

São Paulo, 27 de agosto de 2009

Prezada Profa. Norma Possa Marroni,

Referente ao artigo intitulado: **Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* Benth (SACACA) in diabetic rats (Reg. 26/09– refira-se sempre a este número)** de autoria de Graziella Rodrigues, Éder Marcolin, Sílvia Bona, Marilene Porawski, Mauricio Lehmann e Norma Possa Marroni, comunicamos que o referido foi aprovado pela Comissão Editorial dos ARQUIVOS de GASTROENTEROLOGIA e deverá ser publicado, num dos próximos números desta Revista.

Renovamos os agradecimentos e nos subscrevemos,



Atenciosamente

Dr. RICARDO GUILHERME VIEBIG

- Editor Executivo -

4.2 Artigo 1

HEPATICS ALTERATIONS AND GENOTOXIC EFFECTS OF *Croton cajucara* Benth (SACACA) IN DIABETIC RATS

Graziella **RODRIGUES**², Éder **MARCOLIN**², Silvia **BONA**²,
Marilene **PORAWSKI**^{2,3}, Mauricio **LEHMANN**¹ and
Norma Possa **MARRONI**^{1,2}

ABSTRACT – Context - *Croton cajucara* Benth is a plant found in Amazonia, Brazil and the bark and leaf infusions of this plant have been popularly used to treat diabetes and hepatic disorders. **Objectives** - This study investigated effects hepatics alterations and genotoxic and antidiabetic effect of *Croton cajucara* Benth bark extracts treatment in streptozotocin-induced diabetic rats. **Methods** - Male Wistar rats were divided into six groups: control rats; control rats treated with *Croton cajucara* Benth extract during 5 and 20 days; diabetic rats, and diabetic rats treated with *Croton cajucara* Benth during 5 and 20 days. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin (70 mg/kg). Eight weeks later we measured glucose, triglyceride, cholesterol and hepatic transaminases on blood. The bone marrow micronucleus assay was used to assess the genotoxic activity of *Croton cajucara* Benth. **Results** – Treatment with aqueous extract of *Croton cajucara* was able to significantly reduce levels of triglycerides in diabetic animals, however, did not modify significantly the levels of glucose and cholesterol in these animals. There was no significant elevation in liver transaminases in the control group treated with *Croton cajucara* Benth, as there was no genotoxic effect of treatment in this model. **Conclusion-** The aqueous extract from the bark of *Croton cajucara* Benth was hypolipidemic, suggesting its use to prevent the dyslipidemia found in diabetic patients

HEADINGS –Diabetes mellitus. *Croton cajucara* Benth.Rats.

¹ Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil; ² Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil; ³ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre , Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: Dr. Norma Possa Marroni, Rua José Kanan Aranha, 102 – 91760-470 – Porto Alegre, RS, Brazil - e-mail: nmarroni@terra.com.br

INTRODUCTION

The Amazonian region, because of its large biodiversity and popular culture, is characterized by the use of medicinal plants for treatment of various diseases. However, the indiscriminate use of some plant species may lead to serious problems to the human health.

Croton cajucara Benth - CcB (of the Euphorbiaceae family), commonly known as Sacaca, is a shrubby plant found in Amazonia, North Brazil^(5, 28), whose bark and leaf infusions have been popularly used to treat diabetes, diarrhea, malaria, fever, gastrointestinal, renal and hepatic disorders, as well as in the control of cholesterolemia^(11, 15). The wide use of Sacaca for medical purposes in North Brazil and, now, in the Southeast and South regions, is associated with the appearance of numerous clinical cases where side effects are seen, many of which connected with the plant's hepatotoxicity due to continued intake.

In Belém, PR, north of Brazil, it is popularly known that the steady intake of CcB leaves is beneficial because it causes a healthy weight loss. It is also known that the plant can be toxic. Nevertheless, such awareness is not strong enough to prevent its use, and people feel encouraged to take it, feeling that the benefits outweigh the damages^(18, 19, 20, 29).

Indeed, cases of acute, chronic and fatal hepatitis were reported in the Amazonian region and in other regions of the country in patients who made use of Sacaca to lose weight and reduce cholesterol levels^(19, 20).

In the School Hospital of the "Universidade Federal do Pará", Belém, PR, there is a significant documented history of people affected by liver disorders who were drinking CcB leaf teas in long-lasting diets for weight loss. The connection between hepatitis and Sacaca became remarkable in the Amazonian region, particularly after this plant began to be sold for the purposes of weight loss and cholesterol reduction^(4, 14).

The possibility of developing hepatotoxicity may be related to the susceptibility of the liver to external agents, mainly chemical ones, to the high level of these substances in the organ, its high metabolic activity and its anatomic localization, as an intermediate agent between the places of absorption and systemic circulation, working as a filter and as an entry point of several substances ingested⁽²²⁾.

A study performed in 2004, Amazonian people who used Sacaca for 36 months documented 25 cases of hepatotoxicity ascribed to Sacaca consumption, with evidence that 21 people had acute hepatitis, 3 chronic hepatitis, and 1 fulminating hepatitis⁽²⁷⁾.

Many traditional plants have been claimed to be useful for the control of problems caused by hyperglycemia^(3, 21).

The pharmacological activity of the bark extract main component, trans-dehidrocrotonine (t-DCTN), has been extensively studied^(17, 26).

Rats treated with t-DCTN (50 mg/kg) showed a significant reduction in the streptozotocin-induced increase in blood glucose levels as well as in the ethanol-induced increase in blood triglycerides⁽²⁶⁾. This compound demonstrated a significant hypoglycemic activity in alloxan-induced diabetic rats but not in normal rats. The drug also effectively lowered the blood sugar levels in glucose fed normal rats⁽⁷⁾. Hyperlipidemic mice treated with CcB bark aqueous infusion had the level of triglycerides reduced and the level of cholesterol redistributed⁽³⁾. In vivo studies confirmed that t-DCTN is not genotoxic nor cytotoxic to mice bone marrow cells^(1, 25).

The aim of this work was to determine hepatic alterations, genotoxic activities and the potential effects of CcB bark extract in long term (chronic) diabetic rats.

METHODS

Plant material

Bark fragments of *Croton cajucara* Benth were collected in Santarém, North Brazil. The bark (5 g) was ground and mixed with boiling water (100 mL) to provide a 5% aqueous extract. After 10 minutes, the mixture was filtered with filter paper and the extract was administered to the rats.

Animals

The experimental procedures complied with the rules established by the "Research in Health and Animal Rights" according to the Commission of Research and Ethics in Health of the Research and Postgraduate Group of the "Hospital de Clínicas de Porto Alegre"⁽⁹⁾ (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)", Porto Alegre, RS, Brazil.

Fifty male Wistar rats weighing 200-300 g were used. They were obtained from the Experimental Animals Breeding Colony of the "Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS" (CREAL). They were kept at the Animal Experimentation Unit of the Research Center of the HCPA, in plastic boxes measuring 47x34x18cm lined with wood chips, in a 12-hour dark/light cycle (light from 7 a.m. to 19 p.m.) in a temperature – controlled environment (22 ± 4°C).

Groups and treatment protocols

The rats were randomly divided into six groups. In three groups, diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (70 mg/kg body weight; Sigma Chemical) in freshly prepared 10 mmol/L sodium citrate, pH 4.5. Five days after streptozotocin injection, plasma glucose concentration was measured using retro-orbital blood samples obtained from rats after overnight food deprivation. A plasma glucose level >250 mg/dL was considered indicative of diabetes.

The experimental groups comprised: I - normal control group (Co: n = 10) received 1,5 mL of distilled water administered intragastric (i.g.); II

- group treated with CcB for 5 days (CcB5D: n = 10): 1,5 mL of the CcB extract i.g. during the last 5 days before killed; III - group treated with CcB for 20 days (CcB20D: n = 10): 1,5 mL of the CcB extract i.g. for 20 days before killed; IV - diabetic group (DM: n = 10): 1,5 mL of distilled water i.g.; V - diabetic group treated with CcB for 5 days (DM + CcB5D: n = 10): 1,5 mL of the CcB extract i.g. during the last 5 days before killed; and VI - diabetic group treated with CcB for 20 days (DM + CcB20D: n = 10) 1,5 mL of the CcB extract i.g. for 20 days before killed.

Biochemical analysis

All animals were killed 8 weeks after streptozotocin administration. The rats were anaesthetized with 2% xylazine hydrochloride (50 mg/kg) and ketamine hydrochloride (100 mg/kg) i.p., and a sample of venous blood was collected in two aliquots from the orbital net for determination of glycemia, triglycerides, and cholesterol levels (Labtest kits) and for aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and alkaline phosphatase (AP) activities (performed by the Laboratory of Pathology of HCPA).

Micronucleus assay (MN)

The animals of all groups were killed by cervical dislocation. The MNs were prepared according to the method of MacGregor et al.⁽¹⁶⁾. Briefly, the femurs of each animal were dissected out, and the bone marrow was flushed out into fetal calf serum (FCS) separately. The cells were pelleted by centrifugation and the excess of supernatant was discarded. The pellet and 0.5 mL of supernatant were mixed thoroughly. Smears were drawn onto precleaned coded slides using a drop of the resultant suspension in FCS. The slides were air-dried for 24 hours and stained with Leishman solution. Two thousand polychromatic erythrocytes were analyzed per rat. The slides were scored blindly using a light microscope with a 100x immersion objective. Data regarding the polychromatic and normochromatic erythrocyte (PCE/NCE) ratio were also

collected, in which a minimum of 400 erythrocytes per animal were scored.

The results were expressed as mean values \pm SEM. The data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Student Newmann Keuls test. For micronucleus test, the means were compared with the Tukey test and expressed as mean \pm SDM. Significance was accepted at $P<0.05$.

RESULTS

Biochemical analysis

Blood plasma glucose, triglycerides, and cholesterol levels in streptozotocin-treated rats were significantly higher than in the Co and in CcB-treated animals (CcB5D and CcB20D). Glucose and cholesterol levels were not affected by CcB treatment in diabetic animals. On the other hand, triglyceride concentration in the plasma of streptozotocin-treated rats was significantly lower after treatment with CcB for 5 and 20 days (Table 1).

The biochemical analysis showed that the diabetic group had higher ALT and AP levels than the control group. Treatment reduced ALT level only in diabetic rats. ALT, AST and AP were not affected by CcB treatment in non-diabetic animals (Table 2).

Genotoxic potential

Table 3 displays the micronucleus frequency in the animals treated in vivo. Although the diabetic rats increased PCEs as compared to the controls, significant differences were not observed between the groups. Similarly, no difference in the PCE/NCE ratio was found in any of the groups analyzed.

DISCUSSION

A vegetal specie from Amazon region, CcB is widely used by the local population to treat gastrointestinal conditions, but it can cause hepatic dysfunction and in some cases even fatal hepatitis^(12, 22). Indeed, cases of toxic hepatitis have been reported in several hospitals in Belém, PA, because of excessive consumption of extremely strong CcB tea⁽¹⁷⁾.

Here the effects of a Sacaca herbal extract were evaluated in rat livers. The administration of Sacaca herbal extract in this trial was not able to cause any kind of alteration in the livers with 14 days of drug administration. However, hepatocellular alterations were identified in some animals when the extract was administered for 28 days, and all the animals treated with the drug for 56 days presented hepatocellular necrosis, similar to acute hepatitis. Therefore, it is concluded that Sacaca toxicity is dose-dependent⁽¹⁰⁾.

The liver plays an important role in the digestion, metabolism, and storage of nutrients. Liver injury due to pharmacological treatment plays a significant role⁽⁸⁾. Hepatic damage results in increased concentrations of AST, ALT and AP. The high concentration of serum enzymes such as AST and ALT is generally regarded as one of the sensitive markers of hepatic damage⁽³⁰⁾. In this study, the analysis of serum enzymes showed that there was an increase in ALT and AP in animals as compared to control groups and ALT was decreased in diabetic animals treated for 5 and 20 days. Similar results are observed in studies with CCl₄ intoxication and treatment with *Rhoicissus tridentata*⁽²³⁾ and *Cytisus scoparius*⁽²⁴⁾. Reduction in the levels of serum aminotransferase (ALT and AST) and lactate dehydrogenase (LH) towards the respective normal values by plant extracts indicates stabilization of the plasma membranes, as well as repair of hepatic tissue damage⁽²⁴⁾. The non-diabetic animals treated with CcB bark extract did not show increase in transaminases and AP concentration, indicating the absence of hepatotoxicity in this animal model.

In the present study, it was apparent that the CcB bark extract did not have substantial effect on blood glucose and cholesterol levels. This observation differs from the results of Silva et al.⁽²⁶⁾, who found a hypoglycemic effect of CcB when given to streptozotocin-diabetic rats. These apparently conflicting results are explained by the fact that, in our study, CcB was given in bark aqueous extract form after diabetes had been established, whereas in the previous study the t-DCTN was administrated before the induction of diabetes or 72h after the induction. On the other hand, treatment with CcB bark extract significantly reduced blood triglyceride levels in diabetic rats, and did not have effect on blood triglycerides in non-diabetic rats. Other studies suggest that TG itself is independently related to coronary heart disease^(2, 6), and most of the anti-hypercholesterolemic drugs do not decrease TG levels⁽¹³⁾, but CcB extract treatment returned the triglycerides to control values. This suggests that CcB bark extract has a hypolipidemic activity, and could be used to reverse dyslipidemia associated with diabetes and to prevent the cardiovascular complications that are very prevalent in diabetic patients.

The bone marrow MN was used to assess the genotoxic activity of CcB. The results show that the aqueous extract of CcB bark did not induce any increase in chromosomal damage (chromosomal loss or breakage) when administered to rats with and without diabetes for periods of 5 and 20 days, as compared to the respective control groups (Table 3).

Although the genotoxic activity of the plant species has been little studied, CcB has been described in the literature as not having any genotoxic activity, which corroborates the results obtained in the present study. In fact, Santos et al.⁽²⁵⁾ evaluated the genotoxic activity of methanolic extract of CcB bark using the micronucleus assay in Swiss albino mice treated once a week with three extract concentrations (312.5; 625 and 1,250 mg kg⁻¹ i.g.) for 28 days. The results revealed the absence of genotoxic activity for the three concentrations tested.

Another study carried out with CcB revealed the absence of genotoxic activity using t-DCTN, the most important diterpene isolated from the plant bark. t-DCTN was administered as a single dose via intraperitoneal injection in Swiss albino mice. The genotoxic analysis was carried out using the micronucleus test and chromosomal aberrations in bone marrow cells⁽¹⁾.

In the light of the negative results of the study above, Agner et al.⁽¹⁾ assessed the antimutagenic activity of t-DCTN in the same animals using cyclofosfamide as inducer of genetic damage and the micronucleus and chromosomal aberration assays as investigation protocols. The authors chose two t-DCTN treatment approaches: intraperitoneal injection and gavage. In both protocols, the modulator agent was administered 30 min before the i.p. injection of the genotoxic agent as pre-treatment. The results obtained in the two bioassays evidenced the antigenotoxic activity of t-DCTN against the genetic damage induced by cyclofosfamide, with both modes of administration.

Based on the results obtained in the present study and those published in the literature, it is possible to conclude that the aqueous and methanolic extracts of CcB and of t-DCTN (its main constituent agent) are not capable to induce chromosomal loss and/or breakage in bone marrow cells of rodents. Apart from this, t-DCTN presented anti-genotoxic action in mice, by protecting against the induction of clastogenic and/or aneugenic events. Although further studies should be carried out to broaden the spectrum of genotoxic events to be evaluated, CcB does not seem to pose hazards of genetic damage to humans who ingest the plant extracts.

CONCLUSION

In summary, treatment with CcB bark extract did not affect plasmatic glucose and cholesterol levels, but it was able to significantly reduce triglycerides level. There was no significant alteration in hepatic

transferase in the control group treated with CcB bark extract. In diabetic rats, the treatment reduced the plasmatic level of these enzymes. No genotoxic effect of the treatment was observed in the model studied.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Claudio Augusto Marroni of "Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, RS, Brazil, and Dr. Thêmis Reverbel da Silveira of "Universidade Federal do Rio Grande do Sul" for his wise suggestions.

This study was supported by the Fipe (Financiamento de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and CAPES.

Rodrigues G, Marcolin E, Porawski M, Lehmann M, Marroni NP. Alterações hepáticas e efeitos genotóxicos do *Croton cajucara* Benth (SACACA) em ratos diabéticos. Arq Gastroenterol. 2010;47(3): - .

RESUMO – Contexto - *Croton cajucara* Benth é uma planta encontrada na Amazônia, Brasil. Infusões da casca e folhas desta planta são utilizadas popularmente no tratamento de diabetes e doenças hepáticas. **Objetivos** - Este estudo investigou as alterações hepáticas e os efeitos genotóxicos da casca do extrato do *Croton cajucara* Benth em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. **Métodos** - Ratos Wistar machos foram divididos em seis grupos: ratos controle, ratos controle tratados com extrato de *Croton cajucara* Benth durante 5 e 20 dias, ratos diabéticos e diabéticos tratados com *Croton cajucara* Benth durante 5 e 20 dias. O diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (70 mg/kg). Oito semanas mais tarde foram medidos os níveis de glicose, triglicerídios, colesterol e transaminases hepáticas no sangue. O teste do micronúcleo da medula óssea foi utilizado para avaliar a atividade genotóxica do *Croton cajucara* Benth. **Resultados** - O tratamento com o extrato aquoso do *Croton cajucara* foi capaz de reduzir significativamente os níveis plasmáticos dos triglicerídios nos animais diabéticos, porém, não modificaram significativamente os níveis de glicose e colesterol nesses animais. Não houve elevação significativa nas transaminases hepáticas nos animais do grupo controle tratadas com *Croton cajucara* Benth, assim como também não houve efeito genotóxico do tratamento, no modelo estudado. **Conclusão** - O extrato aquoso da casca do *Croton cajucara* Benth foi hipolipemiante, sugerindo seu uso para prevenir as dislipidemias encontradas em pacientes diabéticos.

DESCRITORES – Diabetes mellitus. *Croton cajucara* Benth. Ratos.

REFERENCES

1. Agner AR, Maciel MAM, Pinto AC, Pamplona SGRS, Colus IMS, 1999. Investigation of genotoxic activity of transdehydrocrotonin, a clerodane diterpene from *Croton cajucara*. Teratogenesis Carcinog Mutagen 1999; 19: 377-384.
2. Bainton D, Miller NE, Botton CH, Yarnell JWG, Suretman PM, Baker IA, Lewis B, Elwood PC. Plasma triglycerides and high density lipoprotein cholesterol as predictors of ischemic heart disease in British man. British Heart Journal. 1992; 68: 60–66.
3. Biguetti EJB, Souza-Brito ARM, De Faria EC, Oliveira HCF. Chronic treatment with bark infusion from *Croton cajucara* lowers plasma triglyceride levels in genetic hyperlipidemic mice. Can J Physiol Pharmacol. 2004; 82: 387-392.
4. Cartágenes PBR, Moreira CC, Teixeira AC, Silveira FAA, Dias-Junior LB, Bichara CDA, Rodrigues ALS, Bensabath G, Soares MCP -Hepatite por Sacaca (*Croton cajucara* Benth): Epidemiologia clínica em 25 casos. GED 1999; 18 (1): 24.
5. Di Stasi LC, Santos EMG, Santos CM, Hiruma CA, 1989. Plantas Medicinais da Amazônia. Editora UNESP,São Paulo, Brazil, 127–128.
6. El-Hazmi MA, Warsy AS, 2001. Evaluation of serum cholesterol and triglyceride levels in 1–6-year-old Saudi children. J Tropical Pediatrics. 2001; 47: 181–185.
7. Farias RAF, Rao VSN, Viana GSB, Silveira ER, Maciel MAM, Pinto AC. Hypoglycemic effect of trans-dehycrotonin, a nor-clerodene diperteno from Croton cajucara. Planta Med.1997; 66, 558-560.
8. Gerbes AL, Ávila MA, Caselmann WH. Liver injury and liver protection: mechanisms and novel treatment strategies. Liver International. 2006; 26: 902-903.
9. Goldin JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. HCPA. 1997; 2^a ed.
10. Graim JFS, Filho GJL, Brito MVH, Matos LTMB. Histologic evaluation of rats liver after Croton Cajucara Bent (sacaca) administration. Acta Cirúrgica Brasileira. 2008;23 (2): 130-134.
11. Hiruma-Lima CA, Gracioso JS, Rodriguez JA, Haun M, Nunes DS, Souza-Brito ARM. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol. 2000; 69: 229–234.
12. Itokawa H, Ichiara Y, Shimizu M, Takeya K, Motidome M. Cajucarins A and B, new clerodane diterpenes from *Croton cajucara*, and their conformations. Chem Pharm Bull. 1990; 38(3): 701-5.

13. Kesari AN, Kesari S, Singh SK, Gupta RK, Watal G. Studies on the glycemic and lipidemic effect of *Murraya koenigii* in experimental animals. *J Ethnopharmacol.* 2007; 12: 305–311.
14. Lima JMC, Fernandes SG, Alencar ML, Medeiros MTG. Hepatite aguda associada ao uso do Croton cajucara, Benth (Sacaca) - Relato de 3 casos. *GED.* 1999; 18(1): 38.
15. Luna Costa AM, Silva JCR, Campos AR, Rao VSN, Maciel MAM, Pinto AC. Antioestrogenic effect of *trans*-dehydrocrotonin, a *nor*-clerodane diterpene from *C. cajucara* Benth in rats. *Phytother Res.* 1999; 13: 689-691.
16. MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salamone MF, Tice RR, Wild T. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research.* 1987; 189: 103-112.
17. Maciel MAM, Pinto AC, Arruda AC, Pamplona SGSR, Vanderlinde F, Lapa AJ, Echevarri A, Cólus IM, Grynberg NF, Farias RAF, Costa AML, Rao VSN. Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology: a successful combination in the study of Croton cajucara. *J Ethnopharmacol.* 2000; 70: 41-55.
18. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF, Martins JR, Grynberg NF, Echevarria A, Lapa AJ, Vanderlinde FA. *Croton cajucara* as an alternative to traditional medicine in a modern health system. In: *Phytochem Pharmacol IISer Recent Prog Med Plants.* 2002; 8: 459-475.
19. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr VF. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova.* 2002; 25: 429-438.
20. Maciel MAM, Cortez JKPC, Gomes FES. O gênero Croton e aspectos relevantes de diterpenos clerodanos. *Revista Fitoter.* 2006; 2: 54-73.
21. Marles RJ, Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137-189.
22. Mincis, M. Doença hepática induzida por drogas: aspectos de interesse clínico. *GED* 1985; 4(4): 102-108.
23. Opoku AR, Ndlovu IM, Terblanche SE, Hutchings AH. In vivo hepatoprotective effects of *Rhoicissus tridentata* subsp. *cuneifolia*, a traditional Zulu medicinal plant, against CCl₄ – induced acute liver injury in rats. *South African Journal of Botany.* 2007; 73: 371-377.
24. Raja S, Nazeer Ahamed KFH, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK. Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109: 41-47.

25. Santos FV, Mesquita SFP, Faria MJSS, Poersh A, Maciel MAM, Pinto AC, Morimoto HK, Cólus IMS. Absence of mutagenicity in somatic and germ cells of mice submitted to subchronic treatment with an extract of *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Genetics and Molecular Biology*. 2006; 29: 159-165.
26. Silva RM, Santos FA, Rao VSN, Maciel MA, Pinto AC. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of transdehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth. in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2001; 3: 452-456.
27. Soares MCP. Would sacaca, *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae) be an hepatotoxic plant like Germander, *Teucrium chamaedrys* L. (Labiatae)? *Ver Soc Bras Med Trop*. 2004; 37: 96-97.
28. Van Den Berg ME. Plantas Medicinais na Amazônia — Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático. 1992; 158–159.
29. Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Medicinal Plants: Safe cure? Quim Nova. 2005; 28: 519-528.
30. Venkateswaran S, Pari L, Viswanathan P. Anti peroxidation effect of Livex, a herbal formulation against erythromycin estolate induced lipid peroxidation in rats. *Phytotherapy Research*. 1998; 12: 465-471.

ANEXO

Table 1: Glucose, triglycerides and cholesterol in the blood plasma.

GROUP	GLUCOSE (mg/dL)	TRIGLYCERIDES (mg/dL)	CHOLESTEROL (mg/dL)
CO	215,97±9,86 ^a	91,58±12,41 ^b	51,85±5,69 ^a
CcB5D	211,8±17,09 ^a	90,2±8,11 ^b	55,6±4,86 ^a
CcB20D	232,08±24,49 ^a	89,66±12,12 ^b	56,08±3,65 ^a
DM	468,8±36,12 ^b	227,3±54,22 ^a	85,1±4,86 ^b
DM+CcB5D	406±15,77 ^b	83,3±9 ^b	72,8±2,50 ^b
DM+CcB20D	418,5±22,82 ^b	91,34±24,34 ^b	71,6±6,12 ^b

Values are mean ± SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

Table 2: Effect of streptozotocin-induced diabetes and Croton cajucara bark extract (CcB) on serum enzymes activities: ALT, AST and AP.

GROUP	AST (U/L)	ALT (U/L)	AP (U/L)
CO	153,90±12,30 ^a	53,20±1,86 ^a	136,20±10,07 ^a
CcB5D	149,4±11,30 ^a	66,5±10,63 ^a	168,2±18,75 ^a
CcB20D	131,73±12,60 ^a	59,45±5,28 ^a	137,45±9,96 ^a
DM	201,8±41,63 ^a	154,1±38,85 ^b	411,3±46,08 ^b
DM+CcB5D	127,3±15,53 ^a	71,33±8,57 ^a	330,4±93,49 ^b
DM+CcB20D	143,3±21,95 ^a	99,8±10,82 ^a	436,2±46,74 ^b

Values are mean ± SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

Table 3: Micronucleated polychromatic erythrocytes frequency (MNPCEs) and rate PCE/NCE in the bone marrow of diabetic and non-diabetic male rats treated with Croton cajucara BENTH stem bark aqueous solution

GROUP	Number of PCEs analysed	Number of micronucleated	
		PCEs in 2000 PCEs ± ST*	PCE/NCE ratio*
CO	20.000	3,88 ± 2,70 ^a	1,11 ± 0,42 ^b
CcB5D	20.000	6,11 ± 1,27 ^a	1,13 ± 0,58 ^b
CcB20D	20.000	3,25 ± 2,25 ^a	1,14 ± 0,43 ^b
DM	20.000	7,25 ± 4,33 ^a	0,93 ± 0,40 ^b
DM+CcB 5D	20.000	6,44 ± 3,47 ^a	1,12 ± 0,46 ^b
DM+CcB20D	20.000	4,22 ± 2,33 ^a	1,02 ± 0,45 ^b

*ST: standard deviation. Values with the same letter do not differ statistically (one-way ANOVA; Tukey *post-hoc* test, $p<0,05$).

4.3 ARTIGO 2

Antioxidant effect and the expression of NF-κB of *Croton Cajucara* BENTH aqueous extract in liver of streptozotocin- induced diabetic rats.

G. Rodrigues², M. Porawski ^{3,4}, É. Marcolin², NA.Kretzmann⁴, N. Possa Marroni^{1,2}

¹Universidade Luterana do Brasil– RS – Brazil

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre – RS – Brazil

³Pontifícia Universidade Católica – RS – Brazil

⁴Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre– RS – Brazil

Abstract

The purpose of this study was to investigate the possible antioxidant effect and the expression of NF-κB of an aqueous extract of *Croton cajucara* BENTH in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. Six groups of 10 male Wistar rats each were used as follows: controls (CO); controls with 5-day treatment with CcB (CcB5D); controls with 20-day treatment with CcB (CcB20D); diabetics (DM); diabetics with 5-day treatment with CcB (DM5D); and diabetics with 20-day treatment with CcB (DM20D). DM was induced by intraperitoneal administration of STZ (70mg/Kg). The aqueous extract (AE) was obtained using 5g of CcB bark for 100ml H₂O and intragastrically administered at a dose of 1.5mL. *In vitro*, the extract showed inhibitory radical scavenging activity against DPPH activities (30.3% of the standard at 5% solution) and 5,51mg of polifenols content. The thioarbarbituric acid reactive substances (TBARS) and superoxide dismutase (SOD) were increased in DM animals and significantly decreased in diabetic animals treated for 5 and 20 days. On the other hand, TBARS and SOD activity were increased in the CcB20D group. Catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities were not significantly different across the studied groups. Gluthatione reductase (GSH) was decreased in the diabetic animals as compared to controls and the DM5D group. The diabetic animals presented an increase in the metabolite levels of nitric oxide as compared to controls, and the administration of CcB AE failed to reverse this situation. There was activation of p65 nuclear expression in the diabetic animals, which was attenuated in the animals receiving the CcB AE. The treatment decreased lipid peroxidation (LPO) and SOD activity, probably because of CcB's antioxidant activity as scavenger of superoxide anion radicals. The results show that in situations where there is no oxidative stress the extended use of CcB behaves acts as a pro-oxidant and in situations where there is oxidative stress the treatment with CcB may be an antioxidant scavenger of free radicals. Furthermore, the results seem to support the hypothesis that the oxidative stress in DM stimulates NF-κB expression and that CcB AE administration reduces this expression.

Introduction

There are convincing experimental and clinical evidences that the generation of reactive oxygen species (ROS) is increased in both type of diabetes, and that the onset of

diabetes is closely associated with oxidative stress (Rosen et al., 2001; Johansen et al., 2005). Free radicals are formed disproportionately in diabetes by glucose oxidation, non-enzymatic glycation of proteins, and the subsequent oxidative degradation of glycated proteins (Pari and Saravanan, 2007).

Oxidative stress, the prevalence of oxidant factors over antioxidant mechanisms, plays a central role in the pathogenesis and progression of diabetes and its complications (Maritim et al., 2003).

Enhanced formation of oxygen free radicals occurs in tissues during hyperglycemia (Baydas el at., 2002). The hyperglycemia can also activate transcription factors, such as nuclear factor (NF)- κ B. This factor regulates the expression of a large number of genes including those who have deeper connection to the complications of diabetes (Evans et al., 2003; Schiekofer et al., 2006).

Hyperglycemia also favors, trough the activation of NF- κ B, an increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is accompanied by increased generation of nitric oxide (Spitaler and Graier, 2002).

Traditional medicines and extracts from medicinal plants have been extensively used as alternative medicine for better control and management of diabetes mellitus (Mosh, 2005). *Croton cajucara* BENTH (of the Euphorbiaceae family), commonly known as Sacaca, is a shrubby plant found in Amazonia, Brazil. (Van Den Berg, M., 1982; Di Stasi, L.C et al., 1989). The bark and leaf infusions of this plant have been popularly used to treat diabetes, diarrhea, malaria, fever, gastrointestinal, renal, and hepatic disorders, as well as in the control of high levels of cholesterol (Luna Costa, A. M. et al., 1999; Hiruma-Lima, C.A. et al., 2000).

Antioxidant effects of *Croton cajucara* BENTH leaf extracts was investigated both *in vitro* and *in vivo* models. Leaf extracts showed radical inhibitory scavenging activity against the stable radical DPPH, and reduced oxidative stress in animals treated with paraquat (Tieppo et al., 2006). Phytochemical analysis on leaf extracts has revealed the presence of flavonoids such as 3,7,4'-tri-O-methylkaempferol and 3,7-di-O-methylkaempferol (Campos et al., 2002).

The liver is the main organ of oxidative and detoxifying processes. In many diseases, biomarkers stress oxidative are elevated in the liver at an early stage (Stadler et al. 2003). Thus, the present investigation was carried out in order to study the possible antioxidant effect and the expression of NF- κ B of *Croton Cajucara* BENTH aqueous extract in streptozotocin-induced liver diabetic rats.

Material and methods

Plant material and preparation of the aqueous extract of *Croton cajucara* BENTH

Bark fragments of *Croton cajucara* BENTH were collected in Amazônia-Santarém, Brazil. The powdered bark (5g) was ground and mixed with boiling water (100mL) to provide 5% aqueous extract. After 20 minutes, the mixture was filtered with filter paper and the extract was administered to the rats.

***In vitro* test for antioxidant activity of *Croton cajucara* BENTH**

The standard antioxidant compound was catequin. To determine the capacity to scavenge the stable free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), catequin solution (0,01%) or bark extract (5, 7.5, 15 and 30%) were mixed with Tris-HCl 100nM buffer solution, pH 7.0, and then added to an ethanol solution of DPPH and kept for 20 min. protected from light. Absorbance was measured in a spectrophotometer at 517 nm. The result was expressed as the percentage of scavenged radical DPPH reduced (Brand-Williams et al., 1985).

Animals and dietary treatment

Male Wistar rats weighing 200-300g were kept in normal husbandry conditions (12h day/light, 25°C, Purina chow feeding). The rats were randomly divided into 6 groups. In 3 groups, diabetes was induced by a single intraperitoneal (i.p.) injection of streptozotocin (70 mg/kg body weight; Sigma Chemical) in freshly prepared 10 mmol/L sodium citrate, pH 4,5. Five days after the STZ injection, plasma glucose concentration was measured using retro orbital blood samples obtained from rats after overnight food deprivation. A plasma glucose level > 250mg/dL was considered indicative of diabetes. The experimental groups comprised: I- normal control group (CO: n=10) received 1,5 mL of distilled water administered intragastrically (i.g.); II- group treated with *Croton cajucara* Benth for 5 days (Cc5D: n=10) 1,5 mL of the *Croton cajucara* Benth extract i.g. during the last 5 days before killed; III- group treated with *Croton cajucara* Benth for 20 days (CcB20d: n=10) 1,5 mL of the *Croton cajucara* Benth extract i.g. for 20 days before killed; IV- diabetic group (DM: n=10) 1,5 mL of distilled water i.g.; V- diabetic group treated with *Croton cajucara* Benth for 5 days (DM5d: n=10) 1,5 mL of the *Croton cajucara* Benth extract i.g. during the last 5 days before killed; and VI- diabetic group treated with *Croton cajucara* Benth for 20 days (DM20d: n=10) 1,5 mL of the *Croton cajucara* Benth extract i.g. for 20 days before killed.

Tissue samples

All animals were killed 8 weeks after administration of streptozotocin and the liver was excised, and immediately frozen at -80°C. The rats were anaesthetized with 2% xylazine hydrochloride (50mg/Kg) and Ketamine hydrochloride (100mg/Kg) i.p. Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7,4) and centrifuged at 3000 rpm for 10 min.

The investigation was conducted in accordance with the HCPA guidelines (Goldin and Raymundo, 1997) and a protocol was approved by the Animal Care Committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Tissue lipid peroxidation measurement

Frozen tissue from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (140 mM KCl, 20 mM phosphate, pH 7.4) and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. Oxidative stress was determined by measuring the concentration of aldehydic products (MDA) by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Buege and Aust 1978). Spectrophotometric absorbance of the supernatant at 535 nm was determined.

Antioxidant enzymes activities

Cytosolic superoxide dismutase (SOD) (EC 1.5.1.1) was assayed at 30°C according to Misra and Fridovich (Misra and Fridovich 1972). The autoxidation rate of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibited 50% of epinephrine autoxidation was defined as 1 U of SOD activity. Catalase (CAT) activity was determined by measuring the decrease in absorption at 240 nm in a reaction medium containing 50mM phosphate buffer (pH 7.2) and 0,3 M hydrogen peroxide (Boveris and Chance 1973). The enzyme activity was assayed spectrophotometrically at 240nm. The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the oxidation rate of NADPH in the presence of reduced glutathione and glutathione reductase (Flohe and Gunzler 1984). The GPx activity was measured with a spectrophotometer at 340 nm. For GSH measurement, it was made according to adapted method by, Kolberg and col (Kolberg et al 2006).

Nitric oxide metabolite

The levels of nitrates and nitrites were measured by the reaction of the samples with Griess reagent. Aliquots of 50 µL were incubated with enzyme cofactors and nitrate reductase for 30 minutes at room temperature for the conversion of nitrate to nitrite. The nitrite formed was then analysed by reaction with the Griess reagent, forming a coloured

compound that was measured by spectrophotometer at a wavelength of 540 nm (Granger et al., 1999).

Western blot

For Western blot analysis of p65 NF- κ B subunit, 75 μ g of nuclear extracts, prepared as described (Gutiérrez et al., 2006) was loaded on an SDS/PAGE gel (10%), electroblotted, and p65 protein was detected using specific polyclonal antibodies (65 kDa) (NF- κ B p65 (C22B4) Rabbit mAb- Cell Signaling). Bound primary antibody was detected, HRP- with Anti-rabbit IgG antibody Cell Signaling and blots were developed using an enhanced chemiluminescence detection system (ECL kit, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden). The density of the specific bands was quantified with an imaging densitometer Software (Scion Image, Maryland, MA).

Statistical Analysis

The results were expressed as mean values \pm SEM. The data were compared by analysis of variance (ANOVA); when the analysis indicated the presence of a significant difference, the means were compared with the Student Newmann Keuls test. For DPPH $^{\cdot}$ the means were compared with the Tukey test and expressed as mean \pm SDM. Significance was accepted at $p<0,05$.

Results

Measurement of the Scavenging Capacity

The radical scavenging activity of the bark extract was estimated by reactivity of the stable radical 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazyl (DPPH $^{\cdot}$). The scavenging capacity for catequin control and for different doses of the *Croton cajucara* bark extract is show in Table 1. Extract showed inhibitory radical scavenging activity against DPPH activities (30.3% of the standard at 5% solution) and 5,51mg of polifenols content (**Table1**).

Effect of CcB on lipid peroxidation and antioxidants

Fig.1 shows the cytosolic concentration of TBARS and activity of different liver antioxidant enzymes. The cytosolic concentration of TBARS increased in streptozotocin-treated rats, and the treatment with CcB during 5 (DM5D) and 20 (DM20D) days significantly reduced the lipid peroxidation. Normal animals treated with the aqueous extract during 20 days (CcB20d) had the lipid peroxidation increased, although significantly less than the diabetic animals. SOD activity was higher in diabetic animals if compared to the controls. This effect was partially abolished by administration of the bark extract. Animals that received only bark extract for 20 days (CcB20D) also had SOD activity increased (**Fig.2**).

Streptozotocin-treatment or administration of bark extract did not significantly modify of CAT (**Fig. 3**) and GPx (**Fig.4**) activity. GSH activity was significant higher in liver. The treatment with CcB during 5 days decreased significantly GSH activity (**Fig. 5**).

Hepatic NF-κB activation (p65 expression)

To study the effects on p65 NF-κB subunit expression, liver nuclear extracts were studied by Western blot. As shown in **Fig. 6** CcB affect NF-κB binding activity in CcB20D. Experimental diabetes markedly induced NF-κB, an effect that was abolished by CcB treatment.

Discussion

Oxidative stress is produced under diabetic condition and it is likely to be involved in progression of pancreatic β-cell dysfunction (Kajimoto and Kaneto, 2004). High levels of free radicals, due to insufficiency of the antioxidant defense system, may lead to disruption of cellular function, oxidative damages to membranes, and enhance their susceptibility to lipid peroxidation (Baynes, 1991). In recent years, dietary plants with antioxidative property have been the center of focus. It is believed that these plants can prevent or protect tissues against damaging effects of free radicals (Osawa and Kato, 2005). In addition, it has been shown that dietary supplementation with natural antioxidants such as vitamins C and E, melatonin, and flavonoids attenuate the oxidative stress and diabetic state induced by STZ (Montilla et al., 1998; Kaneto et al., 1999; Coskun et al., 2005).

Croton cajucara leaf extract exerts effective protection against chemical-induced hepatic injury by mediating antioxidant and free radical scavenging activities (Tieppo et al., 2006), and t-DCTN, the main component of the bark extract, showed hypoglycemic, anti-inflammatory, analgesic, antiulcerogenic, and antilipidemic effects (Maciel et al., 2000; Silva et al., 2001).

The antioxidant capacity of the bark extract was tested *in vitro* by the capacity to scavenge the stable free radical DPPH. The antioxidant effect at 5% of bark extract reduced in 12.21% free radical DPPH. In this concentration, bark extract has 5,51 mg of polyphenols. Polyphenols are widely distributed in foods of plant origin frequently ingested by humans such as fruits, vegetables, teas, and wine. These compounds contain a number of phenolic hydroxyl groups that have strong antioxidant activity and therapeutic potential in some diseases, including cancer, ischemia, heart disease, and atherosclerosis (López-Lazaro, 2002; Aviram and Fuhrman, 2002). Phytochemical studies of bark extracts have

demonstrated the presence of several clerodanes of the diterpene type such as trans-dehydrocrotonine, trans-crotonine, cis-cajucarine and sacarine (Maciel et al., 2000).

Increased levels of TBARS, an end product of lipoperoxidation, were found previously in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats (Cho et al., 2002; Yilmaz et al., 2004; Dias et al., 2005; Taleb-Senouci, 2009; Di Naso et al, 2010). In this study, the TBARS increase confirms this finding, what indicates an overall oxidative stress increase in diabetic rats. Treatment with *Croton cajucara* bark extract suggests an amelioration of oxidative stress.

Oxidative stress is the result of a redox imbalance between the generation of ROS and the compensatory response from the endogenous antioxidant network. Although some studies which measured activities of SOD, catalase, and glutathione peroxidase in diabetes mellitus showed reduction in the levels of these enzymes (Ozkaya et al., 2002; Coskun et al., 2005), other authors reported an increase in SOD, CAT, and GPx activities in streptozotocin-induced diabetic rats (Sanders et al., 2001; Yilmaz et al., 2004; Dias et al., 2005). These apparently contradictory results could be due to tissue specificity, variation in severity and duration of the disease, or other experimental conditions (Essani et al., 1996). Hyperglycemia results in increased enzymatic conversion of glucose to the polyalcohol sorbitol with concomitant decreases in NADPH and glutathione (Brownlee, 2001). The resulting loss of antioxidant reducing equivalents results in enhanced sensitivity to oxidative stress associated with intracellular ROS. In the present study, SOD activity increased in diabetic rats. This effect, may thus be an adaptive response for increased oxidative stress in the liver tissue; *Croton cajucara* bark extract by \square itochondr ROS, prevents the elevation of this antioxidant enzyme activities in diabetic rat liver. This suggests the possibility of a radical superoxide scavenger activity. In our study, CAT and GPx activity remained unchanged. One consequence of hyperglycemia is increase the metabolism of glucose by sorbital pathway. Besides this, other pathways, such as fatty acid and cholesterol biosynthesis also compete for NADPH with GSH. We also observed the decreased in GSH in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. Under *in vivo* condition, GSH acts as an antioxidant and its decrease is reported in diabetes mellitus: Vijayakuma et al., 2006 and Chakraborty and Das (2010) showed that GSH level was significantly lower in diabetic rats than normal rats. In the present study we found that, treatment with *Croton cajucara* bark extract significantly increased the glutathione when compared to diabetic control rats where the levels were significantly decreased. This increased GSH in rats treated with *Croton cajucara* bark for 5 days extract may be one of the factors responsible for the inhibition of lipid peroxidation.

The NF- κ B has been proposed to form a critical bridge between oxidant stress and the cellular response (Barnes and Karin, 1997; Thurberg and Collins, 1998). One mechanism

by which hyperglycaemia- induced oxidative stress might alter cellular functions is activation of the transcription factor NF- κ B (Schiekofer et al., 2006). Rodrigues and col. (2009) shown than glucose concentration in the blood plasma of streptozotocin-treated rats was significantly higher than in the normal control group and in the animals treated with CcB (CcB 5D and CcB 20D). In our study, to evaluate the liver tissue of diabetic animals found significant increase in the activation of NF- κ B. In contrast, the treatment with CcB prevented NF- κ B activation.

In summary, the results show that in situations where there is no oxidative stress the extended use of CcB behaves acts as a pro-oxidant and in situations where there is oxidative stress the treatment with CcB may be an antioxidant scavenger of free radicals. Furthermore, the results seem to support the hypothesis that the oxidative stress in DM stimulates NF- κ B expression and that CcB AE administration reduces this expression.

Acknowledgements

This study was supported by the CAPES and FIPE (Financiamento de pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

REFERENCES

- Aviram, M., Fuhrman, B., 2002. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. In: Alcohol and Wine in health and disease. Annals of the New York Academy of Sciences. 957, 146-161.
- Barnes, P.J., Karin, M., 1997. Nuclear factor- κ pab: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. N. Engl. J. Med. 336, 1066-1071.
- Baynes, J.W., 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. Diabetes 40, 405-412.
- Beckman, J.S., Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. Am. J. Physiol. 271, C1424-C1437.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem. J. 134, 707-716.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebe. Wis. Techn. 28, 25-30.

- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 414, 813–20.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-309.
- Campos, A.R., Albuquerque, F.A.A., Rao,V.S.N., Maciel, M.A.M, Pinto, A.C., 2002. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. *Fitoterapia*. 75, 116-220.
- Chakraborty, U., Das, H., 2010. Antidiabetic and Antioxidant Activities of *Cinnamomum tamala* Leaf Extracts in STZ-Treated Diabetic Rats. *Global J. Biotech. Biochem.* 5, 12-18.
- Cho, S.Y., Park, J.Y., Park, E.M., Choi, M.S., Lee, M.K., Jeon, S.M., Jang, M.K., Kim, M.J., PARK, Y.B., 2002. Alteration of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin. Chim. Acta* 17, 109-117.
- Coskun, O., Kanter, M., Korkmaz, A., Oter, S., 2005. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and -celldamage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* 51, 117–23.
- Dias, A.S., Porawski, M., Alonso M., Marroni N., Collado P.S., Gonzalez-Gallego J., 2005. Quercetin decreases oxidative stress, NFkB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* 135, 2299-2304.
- Di Naso, F., Mello, R.N., Dias, A.S., Porawski, M., Ferraz, A.B.F., Bona., Richter, M.F., Marroni, N.A.P., 2010. Effect of *Agaricus blazei* Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes (*in press*).
- Di Stasi, L.C., Santos, E.M.G., Santos, C.M., Hiruma, C.A., 1989. *Plantas Medicinais da Amazônia*. Editora UNESP,São Paulo, Brazil, pp. 127–128.
- Essani, N.A., McGuire, G.M., Manning, A.M., Jaeschke, H., 1996. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF- κ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells *in vivo*. *J. Immunol.* 156, 2956–63.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2003. Are oxidative stress – activated signaling pathways mediators of insulin resistance and B cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.
- Flohe, L., Guntzler, W.A., 1974. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 105, 115–21.
- Godim, J.R., Raymundo, M.M., 1997. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. HCPA: Porto Alegre, pp.28.
- Granger, D.L., Anstey, N.M., Miller, W.C., Weinberg, J.B., 1999. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods Enzymol.* 301, 49-61.
- Gutierrez, M.B., Miguel, B.S., Villares, C., González-Gallego, J.G., Tuñón, M.J., 2006. Oxidative stress induced by Cremophor EL is not accompanied by changes in NF- κ B activation or iNOS expression. *Toxicology* 222,125-31.

- Hiruma-Lima, C.A., Gracioso, J.S., Rodriguez, J.A., Haun, M., Nunes, D.S., Souza-Brito, A.R.M., 2000. Gastroprotective effect of essential oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphorbiaceae). *J. Ethnopharmacol.* 69, 229–234.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, D.J., Ergul, A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* 4:5.
- Kajimoto, Y., Kaneto, H., 2004. Role of oxidative stress in pancreatic β -cell dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1011, 168–176.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., Hori, M., 1999. Possible Protection of Pancreatic b-Cells Against Glucose Toxicity. *Diabetes* 48, 2398–2406.
- Kolberg, A., Rosa, T.G., Puhl, M.T., Scola G, da Rocha Janner D., Maslinkiewicz, A., Lagranha, D.J., Heck, T.G., Curi, R., de Bittencourt, P.I. Jr., 2006. Low expression of MRP1/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumour-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. *Cell Biochem. Funct.* 24, 23-39.
- Leclercq, B., Jaimes, E.A., Raij, L., 2002. Nitric oxide synthase and hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 185-189.
- López-Lazaro, M., 2002. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr. Med. Chem. Antic-Canc. Agentes.* 2, 691-714.
- Luna Costa, A.M., Silva, J.C.R., Campos, A.R., Rao, V.S.N., Maciel, M.A.M., Pinto, A.C., 1999. Antioestrogenic effect of *trans*-dehydicrotonin, a nor-clerodane diterpene from *C. cajucara* Benth in rats. *Phytother. Res.* 13, 689-91.
- Maciel, M. A. M., Pinto, A.C., Arruda, A.C., Pamplona, S.G.S.R., Vanderlinde, F., Lapa, A. J., Echevarri, A., Cólus, I. M., Grynberg, N.F., Farias, R.A. F., Costa, A.M.L., Rao, V.S.N., 2000. Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology: a successful combination in the study of *Croton cajucara*. *J. Ethnopharmacol.* 70, 41-55.
- Madar, Z., Kalet-Litman, S., Stark, A.H., 2004. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology* 73, 106–12.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins III, J.B., 2003. Effect of alpha lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 14, 288–294.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Montilla, P.L., Vargas, J.F., Túnez, I.F., M, Carmem., Munoz de Agueda, M., Cabrera, E.S., 1998. Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effect of melatonin. *J. Pineal. Res.* 25, 94-100.
- Mosh, M.J. 2005. Current and future prospectus of integrating traditional and alternative medicine in the management of diseases in Tanzania. *Tanzan Health Res Bull.* 7, 159-67.
- Osawa, T., Kato, Y., 2005. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1043, 440–451.
- Ozkaya, YG., Agar, A., Yargicoglu, P., Hacioglu, G., Bilmen-Saikcioglu, S., Ozenl., Aliciguzel, Y., 2002. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 28, 377–84.

- Pari, L., Saravanan, R., 2007. Beneficial effect of succinic acid monoethyl ester on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in streptozotocin–nicotinamide induced type 2 diabetes. *Chem. Biol. Interact.* 169, 15–24.
- Prabhakar, S.S., 2004. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* 24, 333–44.
- Rodrigues, G., Marcolin, E., Bona, S., Porawski, M., Lehmann, M., Marroni, N.P., 2009. Hepatic alterations and genotoxic effects of *Croton cajucara* benth (sacaca) in diabetic rats. *Arquivos de Gastroenterologia (in press)*
- Rosen, P., Nawroth, P.P., King, G., Moller, G., Tritschrev, H.J., Packer, L., 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complication. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 17, 189– 212.
- Sanders, R.A., Rauscher, F.M., Watkins, J.B., 2001. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 15, 143–9.
- Schiekofer, S., Galasso, G., Andrassy, M., Aprahamian, T., Schnneider, J., Rocnik, E., 2005. Glucose control with insulin results in reduction of NF- κ B – binding activity in mononuclear blood cells of patients with recently manifested type 1 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 8, 473-482.
- Silva, R.M., Santos, F.A., Rao, V.S.N., Maciel, M.A., Pinto, A.C., 2001. Blood glucose- and triglyceride-lowering effect of transdehydrocrotonin, a diterpene from *Croton cajucara* Benth., in rats. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 3, 452-456.
- Spitaler, M.M., Graier, W.F., 2002. Vascular targets off redox signaling in diabetes mellitus. *Diabetologia* 45, 476-494.
- Stadler, K., Jenei, V., Bolcshazy, G., Somogyi, A., Jakus, J., 2003. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1240–51.
- Tieppo, M., Porawski, M., Salvador, M., Moreira, A.J., Collado, P.S., Gonzales-Gallego, J., Marroni, N.P., 2006. *Croton cajucara* BENTH leaves extract scavenges the stable free radical DPPH and protects against oxidative stress induced by paraquat. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 161-165.
- Taleb-Senouci, D., Ghomari H., Krouf D., Bouderbala, S., Prost, J., Lacaille-Dubois, M.A., Bouchenak, M., 2009. Antioxidant effect of *Ajuga iva* aqueous extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 16, 623-631.
- Thurberg, BL., Collins, T. 1998. The nuclear factor B/inhibitor of kappa B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9, 387-396.
- Van Den Berg, M.E., 1982. Plantas Medicinais na Amazônia — Contribuição ao seu Conhecimento Sistemático. Gráfica Editora Falangola, Belem, Brazil, pp. 158–159.
- Vijayakumar, M., Govindrajan, R., Rao, C.H.C., Shirwaikar, A., Mehrota, S., Pushpangadan, P., 2006. Action of *Hygrophila auriculata* against streptozotocin-induced oxidative stress. *J. Ethnopharmacol.* 104, 356-61.
- Yilmaz, H.R., Yucel, N., Altunas, I., Ozcelik, N., 2004. Protective effect of coffeeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 234-238.

Table 1: Capacity to Scavenging The Free Radical DPPH by different Concentrations of the *Croton cajucara* Bark extract

Extract concentration (p/v)	DPPH scavenging (%)	Polifenols (mg of catequin/L)
30%	57.02±1.7 ^a	33.51 ± 1.03 ^a
15%	31.79±0.1 ^b	13.25 ± 0.03 ^b
7.50%	17.09±1.0 ^c	7.09 ± 0.00 ^c
5%	12.21±1.9 ^{cd}	5.51 ± 0.03 ^d
Catequina 0,01%	40.35±2.18 ^e	

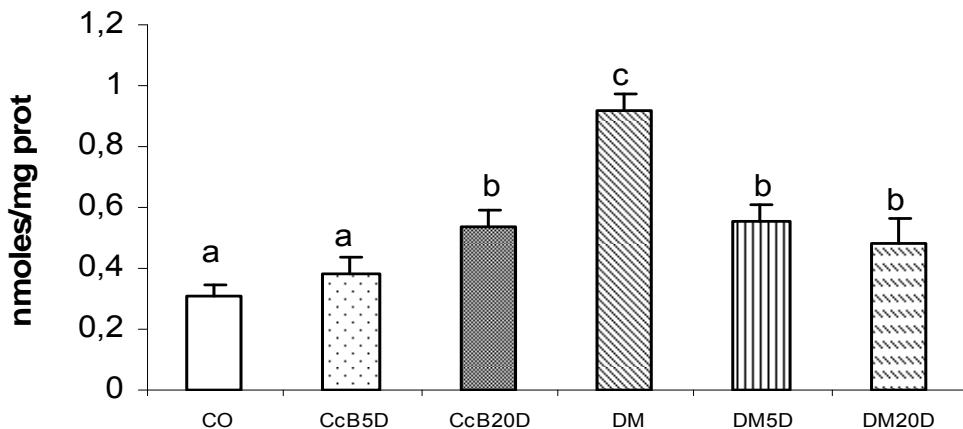


Fig. 1 Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on liver TBARS concentration. Values are mean ± SEM, n=10. Means without a common letter differ, p<0.05.

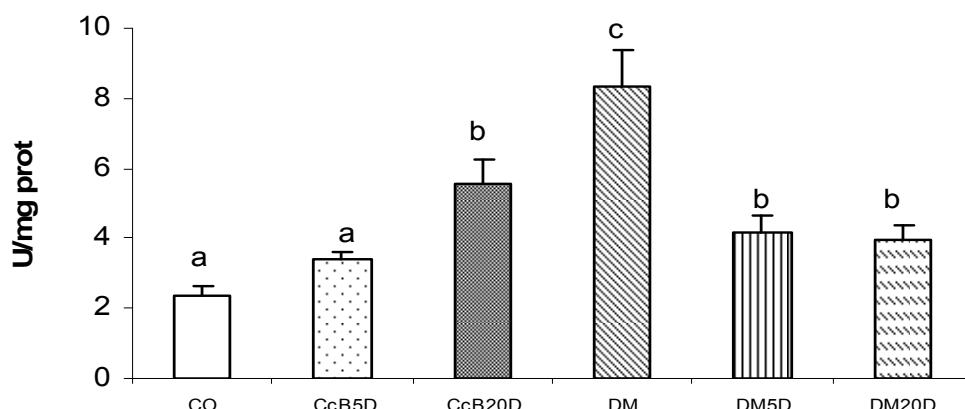


Fig. 2 Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on liver Superoxide Dismutase (SOD) activity. Values are mean ± SEM, n=10. Means without a common letter differ, p<0.05.

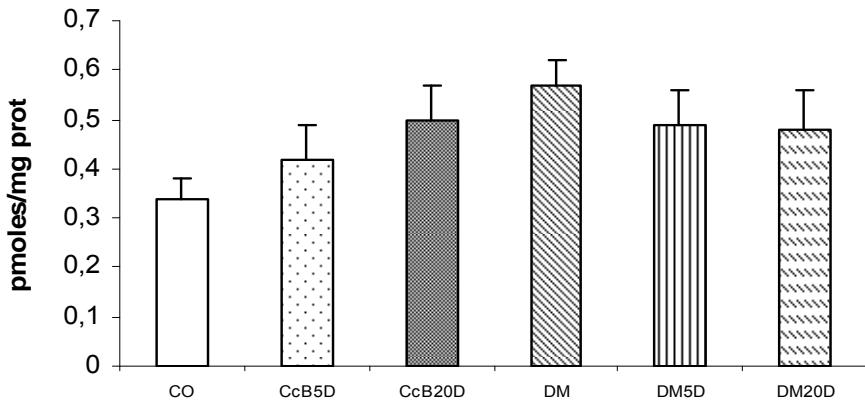


Fig. 3 Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on liver Catalase (CAT). Values are mean \pm SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

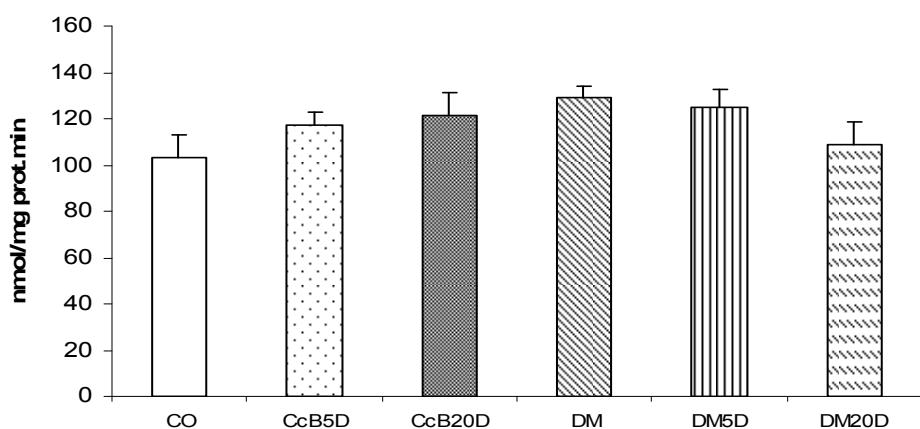


Fig 4-Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on liver glutathione peroxidase (GPx) activity. Values are mean \pm SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

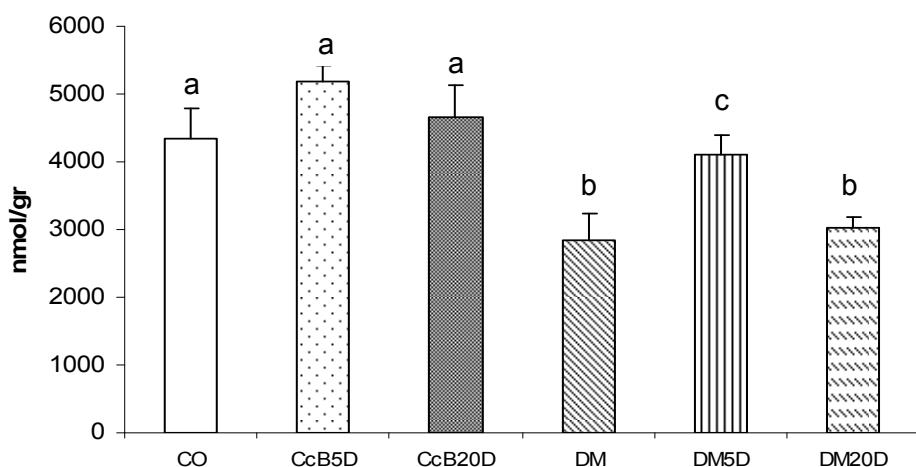


Fig 5-Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on liver glutathione (GSH) activity. Values are mean \pm SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

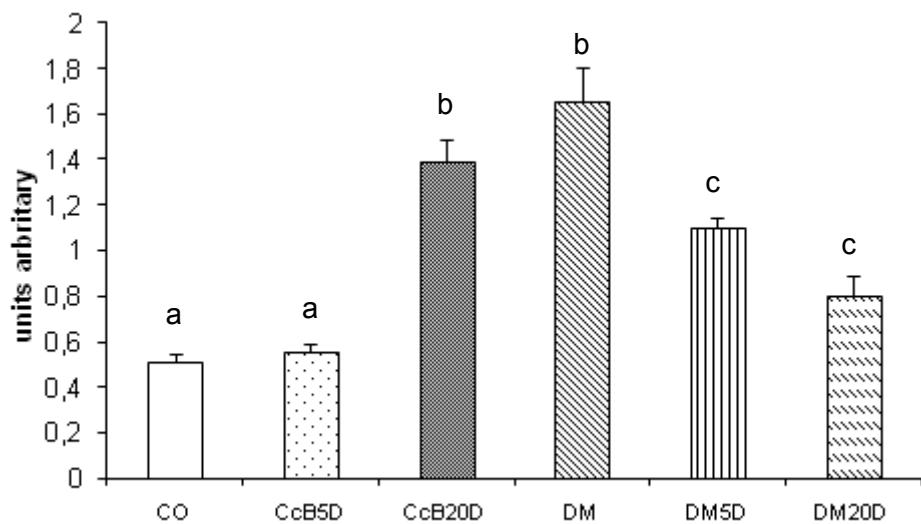
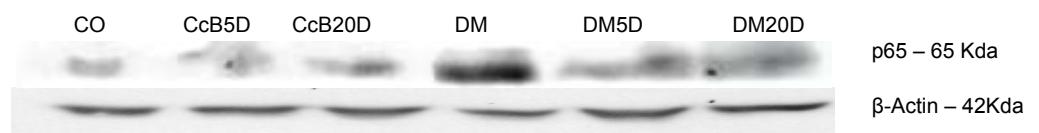


Fig 6-Effect of streptozotocin-induced diabetes and *Croton cajucara* bark extract (CcB) on NF-κB activation. Values are mean \pm SEM, n=10. Means without a common letter differ, p< 0.05.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante o que foi estudado experimentalmente, tendo como elementos os objetivos propostos, conclui-se que

- o tratamento dos animais diabéticos com o extrato aquoso do CcB não diminuiu os níveis de glicemia e de colesterol. Houve, no entanto, redução nos níveis de triglicerídeos nos animais diabéticos tratados durante cinco e 20 dias;
- a administração do extrato aquoso do CcB diminuiu o nível da ALT nos animais diabéticos tratados durante cinco e 20 dias;
- o extrato aquoso do CcB não mostrou atividade genotóxica quando avaliado através do teste de micronúcleos em medula óssea nos grupos estudados;
- a presença do diabetes aumentou a produção de ERO, visto que houve aumento do TBARS e da SOD nos animais diabéticos e diminuição nos animais diabéticos tratados durante cinco e 20 dias. Por outro lado, verificou-se aumento de TBARS e da atividade da SOD no grupo controle tratado durante 20 dias com o extrato aquoso do CcB. A atividade da CAT e da GPx não apresentou diferenças entre os grupos estudados. A GSH não apresentou diferenças entre os grupos controle e controles tratados. Apresentou-se diminuída nos animais diabéticos e aumentou os níveis nos animais diabéticos tratados durante cinco dias. Possivelmente CcB possui ação antioxidante ;
- o diabetes está relacionado com a ativação do NF-κB (p65), visto que houve ativação desse fator nos animais diabéticos e foi atenuado nos animais que receberam o extrato aquoso do CcB.

Os resultados mostram que, em situações nas quais não há estresse oxidativo, o uso prolongado de CcB comporta-se como pró-oxidante e, em situações em que existe estresse oxidativo, o tratamento com o CcB pode possuir ação antioxidante varredora de radicais livres. Além disso, os resultados parecem sustentar a hipótese de que o estresse oxidativo presente do DM estimula a expressão do NF-κB e que administração do EA do CcB reduz essa expressão.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)