

Universidade Federal de Ouro Preto

Escola de Nutrição

Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição

PPGSN

Dissertação

Avaliação do potencial protetor da silimarina na modulação de parâmetros metabólicos e marcadores do estado redox em um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1

Laise Mara Oliveira Miranda

Ouro Preto

2019



UFOP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE
E NUTRIÇÃO



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA SILIMARINA NA
MODULAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E MARCADORES DO
ESTADO REDOX EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS*
TIPO 1**

LAISE MARA OLIVEIRA MIRANDA

OURO PRETO – MG
2019

Laise Mara Oliveira Miranda

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DA SILIMARINA NA
MODULAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E MARCADORES DO
ESTADO REDOX EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES *MELLITUS*
TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

Orientadora: Prof. Dra. Daniela Caldeira Costa
Coorientadora: Dra. Fernanda Caetano Camini

OURO PRETO – MG

2019

M672a

Miranda, Laise Mara Oliveira.

Avaliação do potencial protetor da silimarina na modulação de parâmetros metabólicos e marcadores do estado redox em um modelo experimental de diabetes mellitus tipo 1 [manuscrito] / Laise Mara Oliveira Miranda. - 2019. 69f.: il.: color; graf; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Daniela Caldeira Costa.

Coorientadora: Profª. Drª. Fernanda Caetano Camini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Departamento de Nutrição . Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição .

Área de Concentração: Saúde e Nutrição.

1. Silimarina. 2. Silybum marianum. 3. Diabetes tipo 1. 4. Estresse oxidativo. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Camini, Fernanda Caetano. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.379-008.64

FOLHA DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
NUTRIÇÃO



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 13 dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 13:30 horas, nas dependências da Escola de Nutrição (Enut), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Laise Mara Oliveira Miranda, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Presidente - UFOP), pela Profa. Dra. Melina Oliveira de Souza (Membro - UFOP), pelo Prof. Dr. Pedro Henrique de Amorim Miranda (Membro - Externo) e pela Dra. Fernanda Caetano Camini (Co-Orientadora - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação do Potencial Protetor da Silimarina na Modulação de Parâmetros Metabólicos e Marcadores do Estado Redox em Um Modelo Experimental de Diabetes Tipo 1". Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Prof. Dr. Pedro Henrique de Amorim Miranda; segundo Profa. Dra. Melina Oliveira de Souza; terceiro Dra. Fernanda Caetano Camini; quarto Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 13 de dezembro de 2019.

Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa Calsavara

Presidente

Dra. Fernanda Caetano Camini

Profa. Dra. Melina Oliveira de Souza

Prof. Dr. Pedro Henrique de Amorim Miranda

Mestranda

À Deus, meu guia, protetor, mestre, autor da minha história, de todos os caminhos
escolhidos e que me abriu portas as quais nunca imaginei adentrar;
à minha pipoquinha Lívia, meu bem mais precioso, minha companheira nessa jornada,
que todo dia me ensina o que é ser mãe. Seu amor incondicional me faz crescer e ver a vida
com outros olhos;
ao Fred, meu Bem, sem seu apoio, incentivo e amor não teria chegado até aqui;
a meus eternos super-heróis e exemplos de vida, minha mãe Marilda e meu pai Mendel,
que me dedicam um amor incondicional, compreensão, carinho e força para superação de
qualquer obstáculo,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me permitiu realizar esse trajeto, ora me acompanhando, ora me apoiando, ora me carregando em seus braços. Obrigada pela força e coragem que me permitiram enfrentar e superar todos os percalços. Sou eternamente grata!

À minha filha Lívia, minha dose de força e companhia diária, que, mesmo tão pequena, ensina-me tanto sobre a vida e como vivê-la de forma leve e feliz.

Jamais poderia deixar de agradecer ao Fred, meu marido e companheiro dessa jornada, que primeiro acreditou, me fez ver que era possível e me deu força para enfrentar essa batalha e sempre me animou a terminá-la com êxito! Sem você eu não teria coragem de enfrentar tudo!

Aos meus pais, Marilda e Mendel, pelo amor incondicional, por acreditarem, apoiarem, cuidarem tanto e com tanto carinho de mim. Se cheguei até aqui foi por esforço, desde sempre, de vocês. Gratidão!

Sempre presentes nos momentos que mais preciso, muitas vezes chegando de surpresa, muito boa por sinal, agradeço muito aos meus padrinhos, Zélia e Geraldo, que foram meu apoio nessa mudança e adaptação ao novo.

À minha sogra querida, Tita, e à minha família, agradeço de coração por todo apoio nesse período que estive ausente e só os vendo em momentos geralmente curtos, mas que foram muito valiosos e me auxiliaram imensamente em minha estada em Ouro Preto.

Em especial, agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Caldeira Costa, que desde nosso primeiro encontro, com seu jeito doce e determinado, confiou, apostou no meu potencial, abrindo seu coração e as portas do seu laboratório para que eu me envolvesse e compreendesse o universo acadêmico. Meu muito obrigada pelos sábios ensinamentos e por sempre me mostrar o lado positivo e possível de tudo!

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Fernanda Caetano Camini, pelos ensinamentos, paciência, disponibilidade e atenção: você foi essencial para a conclusão de todo trabalho.

Não poderia esquecer da equipe do LBM e, em especial, a Aline, pelo apoio de sempre, e à Bruna, Luana, Renata, Sttefany e ICs, especialmente à Lívia, que me auxiliou tanto nos experimentos e, mesmo inicialmente, tendo medo dos ratinhos, fazia tudo com amor, seriedade e responsabilidade. Cada uma, do seu jeito, ensinou-me e auxiliou-me nesse trabalho de forma crucial para seu amadurecimento e finalização. Muito obrigada!

A todos do laboratório emprestado de morfopatologia e ao Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima pela colaboração, ensinamentos tão valiosos e por me fazer ver o outro lado dos meus dados: sua participação foi crucial no processo de aprendizado.

À minha turma de mestrado, onde tive o prazer de conhecer pessoas fantásticas, sou muito grata pelo apoio e companheirismo de todos! Em especial à Waléria, Patrícia e Thaís, por toda amizade e carinho com a Lívia, vocês são lindas! Presentes que tive a sorte de encontrar em OP, amigas e parceiras de vida, levarei todas vocês para sempre em meu coração!

Ao PPGSN, professores e pesquisadores competentes que tive a honra de conhecer e/ou trabalhar durante a caminhada científica até o momento, especialmente à Marcella, que sempre, com muita competência, direcionou-nos e apoiou.

Por último, obrigada a Gracinéa pela paciência e pelo auxílio na finalização e na correção dos últimos detalhes na revisão de normas e ortografia deste trabalho: você foi ótima!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Metabólica ICEB/UFOP, Laboratório de Nutrição Experimental ENUT/UFOP e no Laboratório de Morfopatologia ICEB/UFOP, com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), CNPq e UFOP.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade”

Albert Einstein

RESUMO

O diabetes *mellitus* tipo 1 é uma doença caracterizada por insuficiência insulínica e hiperglicemia crônica. Danos oxidativos às células foi relatado como tendo um papel importante na patogênese do diabetes e suas complicações. A silimarina é um composto polifenólico da planta *Silybum marianum* com potencial hepatoprotetor e antioxidante. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da silimarina na modulação de parâmetros metabólicos e estado redox em ratos com diabetes *mellitus* tipo 1. O diabetes foi induzido com o fármaco aloxana por injeção intraperitoneal. Após a confirmação do diabetes, a silimarina foi administrada aos animais utilizando a técnica de gavagem orogástrica com doses de 50 e 100 mg / kg / dia por 30 dias consecutivos. Os animais foram distribuídos em 4 grupos: controle veículo, diabético veículo, diabético + silimarina 50 mg / kg / dia ou diabético + silimarina 100 mg / Kg /dia. Foram avaliados os parâmetros de peso corporal, ingestão de alimentos e água, sendo que, ao final, os animais foram eutanasiados e o soro foi coletado para dosagem de glicose, triacilgliceróis, uréia e creatinina. Foram coletados fígado e pâncreas para dosagem de superóxido dismutase, catalase e proteína carbonilada. Frações do pâncreas também foram utilizadas para as análises histológicas. Nossos resultados mostraram que a silimarina foi capaz de diminuir a ingestão alimentar, hídrica e os níveis de creatinina nos animais diabéticos. Além disto, a silimarina reduziu os níveis de proteína carbonilada no fígado e pâncreas. Contudo, a silimarina não foi capaz de melhorar a função das células beta e diminuir a hiperglicemia dos animais diabéticos. A silimarina diminuiu os sintomas diabéticos relacionados à polifagia e polidipsia, melhorou parcialmente a função renal e protegeu o fígado e pâncreas contra danos às proteínas sem alterar a hiperglicemia dos animais diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes tipo 1; Estresse oxidativo; Silimarina; *Silybum marianum*.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus is a disease characterized by insulin insufficiency and chronic hyperglycemia. Oxidative damage to cells has been reported to play an important role in the pathogenesis of diabetes and its complications. Silymarin is a polyphenolic compound of the plant *Silybum marianum* with potential hepatoprotective and antioxidant. The aim of this study was to evaluate the efficiency of modulation of metabolic and redox parameters in rats with type 1 diabetes mellitus. Diabetes was induced with alloxan by intraperitoneal injection. After diabetes was confirmed, silymarin was administered to animals using orogenic gavage techniques at doses of 50 and 100 mg / kg / day for 30 consecutive days. The animals were divided into 4 groups: vehicle control, vehicle diabetic, diabetic + silymarin 50 mg / kg / day or diabetic + silymarin 100 mg / kg / day. Body weights, food and water intake were monitored, and in the end, euthanized animals and serum were collected for glucose, triacylglycerols, urea and creatinine dosage. Liver and pancreas were collected for measurement of superoxide dismutase, catalase and carbonylated protein. Pancreatic fractions were also used for histological analysis. Our results show that silymarin was able to decrease food intake, water and creatinine levels in diabetic animals. In addition, silymarin reduces the levels of carbonylated protein in the liver and pancreas. However, silymarin was not able to improve beta cell function and decrease the hyperglycemia of diabetic animals. Silymarin decreased diabetic symptoms related to polyphagia and polydipsia, improved renal and protected function, or liver and cancer from protein damage without altering the hyperglycemia of diabetic animals.

Keywords: Type 1 diabetes; Oxidative stress; Silymarin; *Silybum marianum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

Figura 1 – Estrutura e nomenclatura dos principais compostos encontrados na SMN	28
Figura 2 – Linha temporal para o delineamento experimental	33
Figura 3 – Taxa de sobrevivência dos grupos experimentais após indução do DM1	41
Figura 4 – Avaliação da massa corporal, ingestão alimentar e hídrica	43
Figura 5 - Avaliação de parâmetros bioquímicos: glicemia, triacilgliceróis, ureia e creatinina	44
Figura 6 – Avaliação do perfil antioxidante (Superóxido dismutase e Catalase) e do dano oxidativo em proteínas (Proteína Carbonilada) no tecido hepático.....	45
Figura 7 – Avaliação do perfil antioxidante (Superóxido dismutase e Catalase) e do dano oxidativo em proteínas (Proteína Carbonilada) no tecido pancreático.....	46
Figura 8 – A SMN não aumenta o número ou área de ilhotas pancreáticas.....	47
Figura 9 – A SMN não aumenta a biossíntese de insulina nas ilhotas pancreáticas	48
Figura 10 – Efeito da SMN no estado redox hepático, pancreático e regulação metabólica de um modelo experimental de diabetes tipo 1.	54
Tabela 1 - Curva padrão de proteínas.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1C	Hemoglobina glicada
Abs	Absorbância
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AL	Aloxana
ATP	Adenosina trifosfato
BB	<i>Biobreading</i>
C	Grupo controle veículo
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de Ética no uso de animais
CMC	Carboximetilcelulose
Cu/Zn-SOD	SOD-cobre-zinco
D	Grupo diabetes veículo
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DS100	Grupo diabético + Silimarina 100mg/kg/dia
DS50	Grupo diabético + Silimarina 50mg/kg/dia
ENUT	Escola de Nutrição
EREs	Espécies reativas de enxofre
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe-SOD	SOD-ferro
GAD65	Antidescarboxilase do ácido glutâmico
GLP-1	<i>glucagon-like peptide 1</i>
GLUT-2	Transportador de glicose
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSSG	Glutationa oxidada
H&E	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
HOH [•]	Radical peroxila
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IA2 e IA2B	Antitirosina-fosfatases
ICAs	Anticorpos anti-ilhotas pancreáticas
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
KPE	Potássio, fosfato e EDTA
LADA	<i>Latent autoimmune diabetes in adults</i>
LBM	Laboratório de Bioquímica metabólica
Mn-SOD	SOD-manganês
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio]
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κB	Fator de transcrição nuclear-κB

NO	Óxido nítrico
NOD	<i>Non Obese Diabetic</i>
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PGAs	Produtos de glicação avançada
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SH	Grupos sulfidrila
SMN	Silimarina
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TCA	Ácido tricloroacético
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
ZNT1A	Antitransportador do zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Diabetes <i>Mellitus</i>	18
2.2 Modelo experimental de DM1 induzido por AL.....	21
2.3 Estresse oxidativo.....	22
2.4 Estresse oxidativo e diabetes <i>mellitus</i>	24
2.5 Defesas antioxidantes.....	24
2.6 Silimarina.....	27
3 JUSTIFICATIVA.....	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5 METODOLOGIA.....	32
5.1 Animais e cuidados éticos.....	32
5.2 Delineamento experimental.....	32
5.2.1 Indução do diabetes.....	33
5.2.2 Eutanásia e coleta do material biológico.....	33
5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos do soro.....	34
5.4 Análise das defesas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo.....	34
5.4.1 Preparo dos homogenatos.....	34
5.4.2 Dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry.....	35
5.4.3 Defesas antioxidantes: atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	36
5.4.4 Defesas antioxidantes: atividade da enzima catalase (CAT).....	37
5.4.5 Marcador de estresse oxidativo: proteína carbonilada.....	38
5.5 Análise dos parâmetros histopatológicos.....	39
5.5.1 Número e área de ilhotas pancreáticas.....	39
5.5.2 Quantificação de insulina no tecido pancreático.....	39
5.6 Análise estatística.....	40
6 RESULTADOS.....	41
6.1 Taxa de sobrevivência dos animais.....	41

6.2 Avaliação da massa corporal, ingestão alimentar diária e hídrica.....	42
6.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	43
6.4 Efeito do tratamento com a silimarina nos marcadores do estado redox hepático.....	44
6.5 Efeito do tratamento com a silimarina sobre marcadores do estado redox pancreático.....	45
6.6 Análise histopatológica	46
6.6.1 Número e área de ilhotas pancreáticas	46
6.6.2 Quantificação de insulina no tecido pancreático	48
7 DISCUSSÃO.....	49
8 CONCLUSÃO.....	55
9 LIMITAÇÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO I: COMPROVANTE SUBMISSÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	69
ANEXO II: COMPROVANTE SUBMISSÃO DO ARTIGO	70

1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, que geralmente afeta crianças e adolescentes. O DM1 é resultante de insuficiência insulínica, sendo desencadeado por destruição das células β pancreáticas (ADA, 2013). Considerado um problema de saúde pública e epidemia mundial, em 2017 a *Internacional Federation of Diabetes* (IDF) estimou que aproximadamente 1,1 milhões de crianças e adolescentes eram portadores de DM1 e, entre a população mundial de 20 a 79 anos, 425 milhões de pessoas tinham diabetes (IDF, 2017).

Sabe-se que o controle glicêmico adequado tem-se mostrado um fator importante na prevenção das complicações relacionadas à cronicidade da doença (NATHAN et al., 1993), entretanto, o controle da hiperglicemia dificilmente é alcançado (WRIGHT; HIRSCH, 2019). As complicações geralmente se desenvolvem a longo prazo por disfunção e falha de diferentes órgãos, especialmente coração, olhos, rins, nervos e vasos sanguíneos (QUEIROZ et al., 2011). Todas as vias desencadeadas pela hiperglicemia levam à produção de espécies reativas e redução da atividade de enzimas antioxidantes, o que pode culminar em um desequilíbrio redox, o qual está diretamente relacionado às complicações micro e macrovasculares do diabetes (MAIESE, 2015, VOLPE et al., 2018). Níveis aumentados de moléculas geradas por reações de oxidação, como produtos de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, foram detectados no plasma e na urina de pacientes com DM1 (BAYNES, 1991, TANIYAMA; GRIENGLING, 2003).

Devido à associação do estresse oxidativo com o diabetes (DARMAUN et al., 2008), diversas formas alternativas de tratamento têm sido investigadas para serem utilizadas como coadjuvantes ao tratamento convencional da doença, como a utilização de compostos antioxidantes (ARAUJO et al., 2015, GHASEMI et al., 2019, ROSSONI JÚNIOR et al., 2012b) e fitoterápicos ou extratos derivados de plantas (BABU, 2016, DALLAQUA; DAMASCENO, 2011, HADI et al., 2018, STOLF et al., 2018). Diante do exposto, a silimarina (SMN) tem-se destacado por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (GAZAK; WALTEROVA; KREN, 2007, GHARAGOZLOO et al., 2013, SURAI, 2015).

A SMN é um extrato natural obtido dos frutos e sementes da planta *Silybum marianum*, popularmente conhecida como cardo de leite. É composta por sete flavonolignanas (silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina e silidianina) e o flavonoide taxifolina (VARGAS-MENDOZA et al., 2014). A SMN é bem conhecida na literatura por sua

atividade hepatoprotetora e seus efeitos antioxidantes, que se devem à sua capacidade de inibir a produção de radicais livres, que são produzidos a partir do metabolismo de substâncias tóxicas (KARIMI et al., 2011).

Devido ao potencial terapêutico da SMN em diversas doenças e, principalmente, devido as suas propriedades antioxidantes, o objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito protetor da SMN na modulação do estado redox hepático e pancreático, bem como na regulação metabólica de ratas diabéticas tipo 1 induzidos por aloxana (AL).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes *Mellitus*

Diabetes *mellitus* (DM) é uma condição crônica caracterizada por hiperglicemia causada por defeitos na ação e/ou na secreção da insulina (IDF, 2017). A insulina é um hormônio proteico com receptores expressos principalmente no tecido hepático, muscular e adiposo. Ela regula inúmeros processos fisiológicos que compreendem mecanismos da homeostase da glicose sanguínea, diferenciação, crescimento celular, expressão de genes codificadores de enzimas, formação de glicogênio, regulação lipídica e proteica (ROJAS et al., 2018).

Dados da IDF mostram que o Brasil ocupa o quarto lugar mundial em relação ao número de adultos portadores de DM (12,5 milhões) e o terceiro lugar em relação a crianças e adolescentes (faixa etária abaixo dos 20 anos). O DM é considerado um problema de saúde pública mundial e, se forem mantidas as tendências atuais, a perspectiva para 2045 é que 629 milhões de pessoas apresentem o DM (IDF, 2017).

Fatores como transição epidemiológica e nutricional, rápida urbanização, sedentarismo e maior sobrevivência dos indivíduos diabéticos refletem na prevalência aumentada do DM (SBD, 2018). Isso aumenta, conseqüentemente, os gastos com despesas de saúde geradas com o paciente diabético. As despesas estão associadas a custos diretos relacionados à prevenção e ao tratamento de complicações decorrentes da doença, bem como a custos indiretos, relacionados à perda de produtividade e à mortalidade prematura. No Brasil, em 2017, mais da metade do número de mortes por diabetes e suas complicações eram de pessoas com idade inferior a 60 anos (IDF, 2017).

Segundo a *American Diabetes Association* (ADA), a doença pode ser classificada, de acordo com a etiologia, da seguinte maneira: tipo 1 – DM1 (1a - autoimune ou 1b - idiopático); tipo 2 – DM2; gestacional (diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação sem identificação prévia) e outros tipos específicos de diabetes (defeitos genéticos na função da célula β ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e induzidas por drogas e infecções), sendo que o DM1 e DM2 são as formas mais prevalentes (ADA, 2018).

O DM1 é caracterizado por hiperglicemia crônica, podendo ser autoimune (1a) ou idiopático (1b). No DM1, a maioria dos casos é referente à forma autoimune (1a), porém, quando não há detecção de autoanticorpos no sangue, é denominado como idiopático (1b) (ROJAS et al., 2018; SBD, 2018).

A forma autoimune é caracterizada pela destruição imunomediada das células β das ilhotas pancreáticas, o que acarreta incapacidade de produção de insulina pelas referidas células. Esse processo não possui um tempo determinado, podendo durar meses ou anos, ocorrendo sua manifestação sintomatológica quando já houver destruição de, pelo menos, 80% da massa das ilhotas. Esse tipo de diabetes corresponde a 5 – 10% dos casos, sendo mais frequente em crianças e adolescentes, mas também pode ser diagnosticado em adultos (CHEON, 2018; SBD, 2018). A taxa de destruição das células β varia entre crianças e adultos, sendo que, geralmente em crianças, ocorre de forma mais abrupta, já em adultos de forma mais lenta e progressiva e, nestes, o diabetes é referido como *Latent Autoimmune Diabetes in Adults* (LADA) (ADA, 2018).

A destruição autoimune das células β é mediada por linfócitos T e autoanticorpos. Além disso, possui múltiplas predisposições genéticas, estando também relacionada a fatores ambientais ainda não muito bem definidos. Os marcadores de autoimunidade associados ao DM1 abrangem os anticorpos anti-ilhotas pancreáticas (ICAs), a antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD65), as antitirosina-fosfatases (IA2 e IA2b) e, mais recentemente, o autoanticorpo transportador do zinco (ZnT1A). Tais marcadores podem ser detectados de meses a anos antes do diagnóstico clínico, caracterizando a fase pré-clínica da doença (KORDONOURI et al., 2014, ADA, 2018, ROJAS et al., 2018).

O tratamento convencional é a administração de insulina exógena subcutânea com quantidade de aplicações variáveis diariamente, sendo a base da terapia para a sobrevivência sem outras opções de tratamento confiáveis disponíveis até o momento. Embora os avanços na administração da insulina, o monitoramento contínuo da glicose e a melhoria nas formulações de insulina tenham facilitado o tratamento, o controle da glicose ainda permanece complexo e a maioria dos pacientes é inadequadamente controlada. Sendo assim, terapias adjuvantes que possam auxiliar no controle glicêmico do DM1 são extremamente necessárias (PERKINS et al., 2019).

O DM2 é a forma mais prevalente da doença, sendo responsável por cerca de 90% dos casos. O DM2 acomete geralmente indivíduos após os 40 anos de idade, mas tem sido cada vez mais diagnosticado em crianças, adolescentes e adultos jovens, pela sua estreita relação com hábitos de vida, obesidade e sedentarismo (IDF, 2017). É caracterizado por hiperglicemia, que pode ser gradual, e possui como etiologia defeitos na secreção de insulina (falência das ilhotas β pancreáticas) e/ou resistência à insulina. O DM2 é considerado uma doença metabólica complexa, multifatorial, com interações ambientais e genéticas que, a longo prazo, pode levar a complicações e a comorbidades, que podem levar ao risco de vida (JAVEED; MATVEYENKO, 2018).

Após o diagnóstico do DM2, geralmente no início do tratamento, o paciente não necessita de insulina exógena. Muitas vezes, a mudança para um estilo de vida mais saudável, incluindo dieta equilibrada e manutenção da massa corporal, podem auxiliar e manter a glicemia mais estável. Porém, quando esses hábitos não são adotados ou não se consegue o controle glicêmico, a medicação oral ou mesmo a insulina podem ser utilizadas para obtenção de um controle metabólico adequado (ADA, 2018; IDF, 2017).

Os sintomas clássicos do DM são muito parecidos. No DM1, incluem-se sede anormal, boca seca, micção frequente e enurese, perda repentina de peso, fadiga, fome constante e visão turva. Já no DM2, são mais proeminentes o aumento da sede, micção frequente, fadiga, cicatrização lenta de feridas, infecções recorrentes e formigamento ou dormência nas mãos e pés. No DM1, a apresentação dos sintomas é mais abrupta, diferentemente do DM2, que possui início lento e geralmente não apresenta o distúrbio metabólico agudo (cetoacidose) presente no DM1, o que dificulta muito precisar o início da doença e também seu diagnóstico (IDF, 2017).

Para o diagnóstico do DM são utilizados, além da avaliação sintomatológica, que geralmente é mais evidente no DM1, exames de sangue como a glicose em jejum, glicose 2 horas após sobrecarga de dextrosol, glicose ao acaso e hemoglobina glicada (A1C), além do rastreio de autoanticorpos. O diagnóstico tem o papel crucial e determinante para o tratamento e prevenção eficazes das complicações micro e macrovasculares relacionadas à doença (ADA, 2018).

Quando a hiperglicemia se mantém e o controle glicêmico não é alcançado, pacientes com DM1 e DM2 podem desenvolver as mesmas complicações crônicas, embora diferindo nas taxas de progressão (ADA, 2018, FAN, 2017). Além disso, outros fatores associados como a hipertensão arterial sistêmica, a dislipidemia e o tabagismo também estão envolvidos na gênese das complicações principalmente no DM2 (QUEIROZ et al., 2011). As complicações relacionadas ao DM são desencadeadas por distúrbios na homeostase da glicose com complicações micro e macrovasculares, desencadeando um comprometimento da angiogênese. A angiogênese é um processo complexo responsável pela formação e estabilização de vasos sanguíneos. Aumento ou diminuição da angiogênese no DM pode levar a complicações crônicas severas microvasculares como a neuropatia, retinopatia e nefropatia e macrovasculares como doenças cardiovasculares, doença vascular periférica e cerebral, além do comprometimento da cicatrização de feridas, que pode ocasionar amputações de membros e também o aumento da susceptibilidade a infecções (QUEIROZ et al., 2011, STOLF et al., 2018).

2.2 Modelo experimental de DM1 induzido por AL

Diante da complexidade de todos os mecanismos envolvidos no DM, faz-se necessário a pesquisa para o entendimento dos fatores envolvidos com esta doença e também das terapias adjuvantes que possam auxiliar no tratamento e evitar as complicações dela.

Diversos modelos são utilizados para o estudo do DM, incluindo a manipulação química, cirúrgica, genética e imunológica (RADENKOVIĆ; STOJANOVIĆ; PROSTRAN, 2016), com a utilização de técnicas que envolvem injúria ao hipotálamo ventromedial, pancreatectomia, dietas ricas em açúcares, gorduras, doses altas de glicocorticoides (hormônios contra regulatórios) ou má nutrição *in útero* (AL-AWAR et al., 2016, SILVA; NOGUEIRA, 2015, TRIPATHI; VERMA, 2014). Para o DM1, existe também o modelo espontâneo, que consiste na ocorrência da doença de forma autoimune, semelhante ao ser humano. Os ratos BB (*Biobreading*) e os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) se mostram excelentes alternativas, sendo este último o modelo mais utilizado (KIRSTEN; SESTERHEIM; SAITOVITCH, 2010).

A indução química do DM1 é amplamente aceita por sua simplicidade, conveniência e principalmente por exibir a sintomatologia, alterações bioquímicas, hormonais e morfológicas do estágio inicial e após a instalação do quadro diabetogênico (LERCO et al., 2003, SZKUDELSKI, 2001). Para induzir quimicamente o diabetes, frequentemente são utilizados agentes citotóxicos como a estreptozotocina (STZ) e a AL. Tanto a STZ quanto a AL apresentam efeitos citotóxicos seletivos às células β pancreáticas (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017, SILVA; NOGUEIRA, 2015, SZKUDELSKI, 2001).

A AL (2,4,5,6-tetraoxipirimidina;5,6-dióxio-cil) é um composto químico hidrofílico e instável, sendo análogo citotóxico da molécula de glicose (LENZEN, 2008a). É uma das drogas mais utilizadas para induzir o diabetes experimental e para avaliação do potencial antidiabético de extratos de plantas e compostos puros em estudos que abordam o DM1 (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017).

Os efeitos após a administração da AL são demonstrados através dos sintomas observados no modelo animal como hiperglicemia, polifagia, polidipsia, perda de massa corpórea, dentre outros, sintomas semelhantes ao DM1 em humanos. O DM1 é característico quando há uma destruição superior a 90% das células β pancreáticas produtoras de insulina, o que pode ser provocado por destruição química, viral ou autoimune (SILVA; NOGUEIRA, 2015).

Quando administrado por via parenteral (intravenosa, subcutânea ou intraperitoneal), a AL apresenta sua ação diabetogênica, sendo que a dose necessária para indução do DM irá depender da espécie animal, do estado nutricional e da via de administração da droga (FEDERIUK et al., 2004). Devido à sua similaridade com a glicose, após sua administração, a AL é rapidamente transportada para o interior das células β pancreáticas através do transportador de glicose (GLUT-2), onde é captada e acumulada seletivamente, causando a morte das referidas células. Ocorre também absorção da AL no tecido hepático. O fígado, assim como outros tecidos, é mais resistente às espécies reativas de oxigênio (EROs) em comparação com as células β pancreáticas, o que os protege contra a toxicidade da AL (MALAISSE-LAGAE F.; MALAISSE, 1983, SZKUDELSKI, 2001).

O mecanismo de ação da AL é baseado em dois efeitos distintos, que podem ser resumidos em: 1) inibição seletiva da secreção de insulina por estímulo da glicose (inibição da hexocinase IV – glicoquinase). Por possuir um grupo 5-carbonila central, que reage com grupos sulfidríla (SH), a AL possui alta afinidade com a glicoquinase, que possui SH em sua composição e é crucial para a secreção de insulina por estímulo da glicose (LENZEN, 2008a); 2) destruição seletiva das células β através da produção de EROs. Devido à presença de tióis intracelulares como a glutatona reduzida (GSH), e por ser um composto muito instável, a AL facilmente sofre redução de ácido dialúrico, e este sofre auto-oxidação na presença de oxigênio (O_2), produzindo então EROs, que são citotóxicos, causam a necrose das células β e inibem a produção insulínica (LENZEN, 2008a, SILVA; NOGUEIRA, 2015).

Tem sido demonstrado que a progressão e as complicações diabéticas possuem relação direta com a hiperglicemia crônica, a qual pode ser responsável pelo aumento de EROs e consequente pelo estresse oxidativo (VOLPE et al., 2018). Tendo em vista os mecanismos de ação da AL, a hiperglicemia persistente e o estresse oxidativo desencadeado após sua administração, entende-se que a droga se mostra uma boa opção para pesquisas relacionadas ao DM1 e suas complicações.

2.3 Estresse oxidativo

Para cumprir funções biológicas relevantes nos processos metabólicos relacionados à produção de energia (adenosina trifosfato – ATP), ativação gênica, defesa contra microrganismos, dentre outros (BARBOSA et al., 2010), o corpo humano produz fisiologicamente espécies reativas, que podem ser átomos, íons derivados de oxigênio ou moléculas, na maioria das vezes altamente reativas, constituindo três classes de compostos:

espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou espécies reativas de enxofre (EREs), podendo ser denominadas como radicais livres ou compostos não radicalares (MARTELLI; NUNES, 2014).

Quando átomos ou moléculas possuem em seus orbitais externos pelo menos um elétron desemparelhado são designados como radicais livres, o que permite que eles recebam ou transfiram elétrons a moléculas adjacentes. O excesso de radicais livres pode interagir no local de sua geração com a maioria das moléculas orgânicas e inorgânicas – ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, proteínas, aminoácidos, açúcares e metais, produzindo uma alteração no ambiente molecular de seus arredores (PISOSCHI; POP, 2015). Como exemplo de radicais livres, podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}) e o radical peroxila (HOH^{\cdot}). Em relação aos compostos não radicalares, ou seja, que não possuem elétrons livres, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio molecular (O_2), o óxido nítrico (NO) e o ácido hipocloroso (HOCl) são exemplos. Esses são menos instáveis que os radicais livres, porém, ainda assim, muito reativos (SILVA; FERRARI, 2011, MARTELLI; NUNES, 2014).

Existem diversas fontes internas e externas geradoras de espécies reativas no organismo. Dentre as espécies reativas, as EROs são as espécies mais estudadas. Estas são produzidas fisiologicamente e de diversas maneiras pelo metabolismo dos seres vivos, sendo as principais organelas geradoras as mitocôndrias, durante a respiração celular. Por possuírem extensa área de superfície, devido a suas membranas internas, as mitocôndrias contêm enzimas responsáveis pela produção de energia a partir do oxigênio. A transferência de elétrons na cadeia transportadora resulta também na transferência de prótons, gerando um potencial de membrana mitocondrial. Produtos da redução incompleta do oxigênio formam as EROs em parte deste processo e, aproximadamente, 1% a 3% do oxigênio utilizado é convertido em EROs (MURPHY, 2009).

A definição de estresse oxidativo, proposta por Jones (2006), compreende “uma desregulação da sinalização e do controle redox” (JONES, 2006). Esse desequilíbrio desencadeia alterações celulares múltiplas como a lipoperoxidação das membranas celulares, afetando o transporte através da bicamada lipídica, a oxidação proteica, prejudicando o funcionamento das proteínas e ainda alterações na estrutura do DNA (SANTOS et al., 2018). Sendo assim, o estresse oxidativo se torna evidente quando o desequilíbrio redox extrapola o controle fisiológico e o organismo não consegue neutralizar ou inativar as espécies reativas (BARBOSA et al., 2010).

2.4 Estresse oxidativo e diabetes *mellitus*

A associação entre a hiperglicemia, estresse oxidativo e as complicações no DM é amplamente aceita (CERIELLO; TESTA; GENOVESE, 2016, FERREIRA; MATSUBARA, 1997, MAIESE, 2015, SILVA et al., 2011b, VOLPE et al., 2018) e é considerada peça central no desenvolvimento de complicações macro e microvasculares associadas ao DM.

Desencadeando diversas vias de sinalização metabólica, as consequências da hiperglicemia englobam principalmente as vias da auto-oxidação da glicose, via do poli-ol e formação de produtos de glicação avançada (PGAs). (AMORIM et al., 2019).

A via do poli-ol é também estimulada pela glicemia elevada, fazendo com que a enzima aldose redutase converta glicose em sorbitol, o que leva a formação de $O_2^{\cdot-}$, consumo maior do NADPH e comprometimento da disponibilidade do antioxidante glutathiona peroxidase (GSH-Px), induzindo ao desequilíbrio redox. Por fim, a hiperglicemia também promove a formação de PGAs, a partir da interação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, ácidos nucleicos e lipídios e, quando o produto dessa interação se liga aos seus respectivos receptores celulares, ocorre a formação de EROs. Os PGAs também impulsionam fatores de transcrição como o fator de transcrição nuclear- κB (NF- κB), iniciando uma cascata de sinalização intracelular, responsável pela produção de citocinas e EROs (FARINHA, 2018).

Em condições fisiológicas, espécies reativas são produzidas e, através da neutralização pelos sistemas antioxidantes, é reestabelecido o equilíbrio. Este equilíbrio é considerado dinâmico, visto que nos sistemas biológicos, devido ao envolvimento de diversos processos, como a sinalização redox, o organismo pode não responder da mesma forma aos oxidantes e antioxidantes, podendo estes últimos tornarem-se pró-oxidantes em certas condições (SILVA, 2011).

2.5 Defesas antioxidantes

Antioxidantes biológicos podem ser definidos como qualquer substância que, em baixas concentrações relativas a um substrato que seja oxidável, evita ou atrasa significativamente sua oxidação (GODIC et al., 2014).

As defesas celulares antioxidantes podem ser subdivididas em sistema enzimático e não enzimático. Produzidos endogenamente, as principais enzimas do sistema enzimático incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a GSH-Px (SANTOS et al., 2018). Os principais componentes do sistema enzimático são considerados os antioxidantes mais potentes

existentes na natureza possuindo muita eficiência na neutralização de moléculas que possuem o potencial de se transformarem ou com capacidade de induzir a produção de espécies reativas (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A enzima SOD, considerada o antioxidante mais poderoso e a primeira enzima de desintoxicação celular, possui a capacidade de converter o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . Por ser uma metaloenzima, a SOD necessita de um cofator metálico para sua atividade, existindo três formas de SOD: SOD-manganês (Mn-SOD), localizada principalmente nas mitocôndrias dos eucariontes, a SOD-ferro (Fe-SOD), localizada nos seres procariontes e, por último, a forma SOD-cobre-zinco (Cu/Zn-SOD), localizada principalmente no citosol dos eucariotos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018). O produto formado pela SOD, o H_2O_2 , extremamente tóxico para o organismo, difunde-se pela membrana mitocondrial, onde é transformado em água pelas enzimas antioxidantes CAT e GSH- Px (NAUDI et al., 2012).

A CAT é uma hemoproteína altamente eficiente, localizada nos peroxissomos de quase todas as células eucarióticas. Ela atua convertendo o H_2O_2 em O_2 e água (SILVA et al., 2011b). Essa é uma reação de grande importância, visto que o H_2O_2 é extremamente nocivo à célula por ser capaz de atacar cadeias de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas e outras macromoléculas, como as proteínas (GAETANI et al., 1989).

A GSH-Px faz parte do sistema de defesa da glutathiona e também atua convertendo o H_2O_2 em água em períodos de estresse oxidativo, necessitando da ação de cofatores, como a GSH, para o seu funcionamento adequado (PISOSCHI; POP, 2015). A glutathiona está presente em sua maior parte, mais de 90% como GSH e o restante sob a forma de glutathiona oxidada (GSSG). A GSH-Px converte o H_2O_2 em água e para tal oxida a GSH em GSSG; já a glutathiona redutase (GR) reduz a GSSG em GSH (KINNULA et al., 1995).

Para a complementação do sistema de defesa enzimático, o sistema de defesa não enzimático tem uma atuação muito expressiva no organismo. A grande maioria dos antioxidantes não enzimáticos são provenientes de fontes dietéticas e fitoterápicas, mas também podem ser de fonte endógena. São classificados em diferentes classes, sendo que a maior parte abrange a classe dos polifenóis e as outras classes incluem os β -carotenoides, compostos organosulfurados, as vitaminas C, E (α - tocoferol), minerais, coenzima Q e a GSH, possuindo um importante papel na saúde humana (BARBOSA et al., 2010, BOUDERBALA et al., 2010, RATNAM et al., 2006).

Representando uma importante classe de defesas antioxidantes, os compostos polifenólicos ou polifenóis estão amplamente presentes em alimentos e plantas medicinais

utilizadas na alimentação, sendo que os ácidos fenólicos, fenóis, taninos e flavonoides estão entre os polifenóis mais encontrados (FALLEH et al., 2008; PIETTA, 2000).

Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos em grande quantidade por plantas como resposta ao estresse, sendo um mecanismo de defesa contra predadores e doenças (MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010). Tem sido demonstrado grande interesse por essas substâncias, o que é estimulado pelos potenciais benefícios à saúde decorrentes das atividades antioxidantes desses compostos. Seus efeitos antioxidantes estão relacionados a grupos hidroxilas funcionais que possuem a capacidade de eliminar os radicais livres e/ou quelar íons metálicos, o que pode ser crucial na prevenção da geração de radicais que danificam as biomoléculas-alvo (KUMAR; MISHRA; PANDEY, 2013, KUMAR; PANDEY, 2013, LEOPOLDINI et al., 2006).

Por fim, em relação ao mecanismo de ação, os antioxidantes podem atuar em quatro diferentes linhas de defesa, que podem prevenir, eliminar ou reparar danos induzidos por espécies reativas. O sistema de defesa primário se refere aos antioxidantes que suprimem ou impedem a formação das espécies reativas, sendo extremamente rápidos na neutralização de qualquer molécula potencial ou capaz de induzir a produção de radicais livres ou outros tipos de espécies reativas. Como exemplo temos a SOD, CAT, GSH-Px e, também, as proteínas de ligação a íons metálicos como a transferrina e ceruloplasmina que quelam o ferro e o cobre, respectivamente (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A segunda linha de defesa compreende os compostos fenólicos como os flavonoides e tocoferóis (vitamina E), que atuam no bloqueio da propagação da cadeia radicalar (*chain breaking*), onde sequestram radicais intermediários. Já o sistema de defesa terciário constitui-se por sistemas de reparo do DNA, por proteases e fosfolipases que atuam removendo danos oxidativos do DNA, lipídios e proteínas (JORDÃO JR. et al., 1998). Por último, a quarta linha de defesa envolve uma adaptação, na qual ocorre a produção e a reação de radicais livres para impedir a formação ou reação de tais radicais. Tal mecanismo utiliza sinais gerados pelo próprio radical livre formado, induzindo a formação e o transporte de um antioxidante apropriado para o local (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Apesar de todo o esforço envolvido pelo organismo em resolver os danos relacionados à produção de espécies reativas, principalmente no curso crônico das doenças como o DM, muitas vezes a resolução é ineficiente, o que resulta em um estresse oxidativo debilitante.

No DM1, a insulina é considerada a base de tratamento e o controle glicêmico intensivo demonstrou diminuir o risco de complicações micro e macrovasculares (NATHAN et al., 1993). No entanto, apesar das melhorias na formulação de análogos de insulina e dos avanços

tecnológicos do tratamento, muitos indivíduos continuam a ter controle glicêmico abaixo do ideal (WRIGHT; HIRSCH, 2019), o que tem despertado grande interesse no estudo de plantas para serem utilizadas como coadjuvantes no tratamento do DM1.

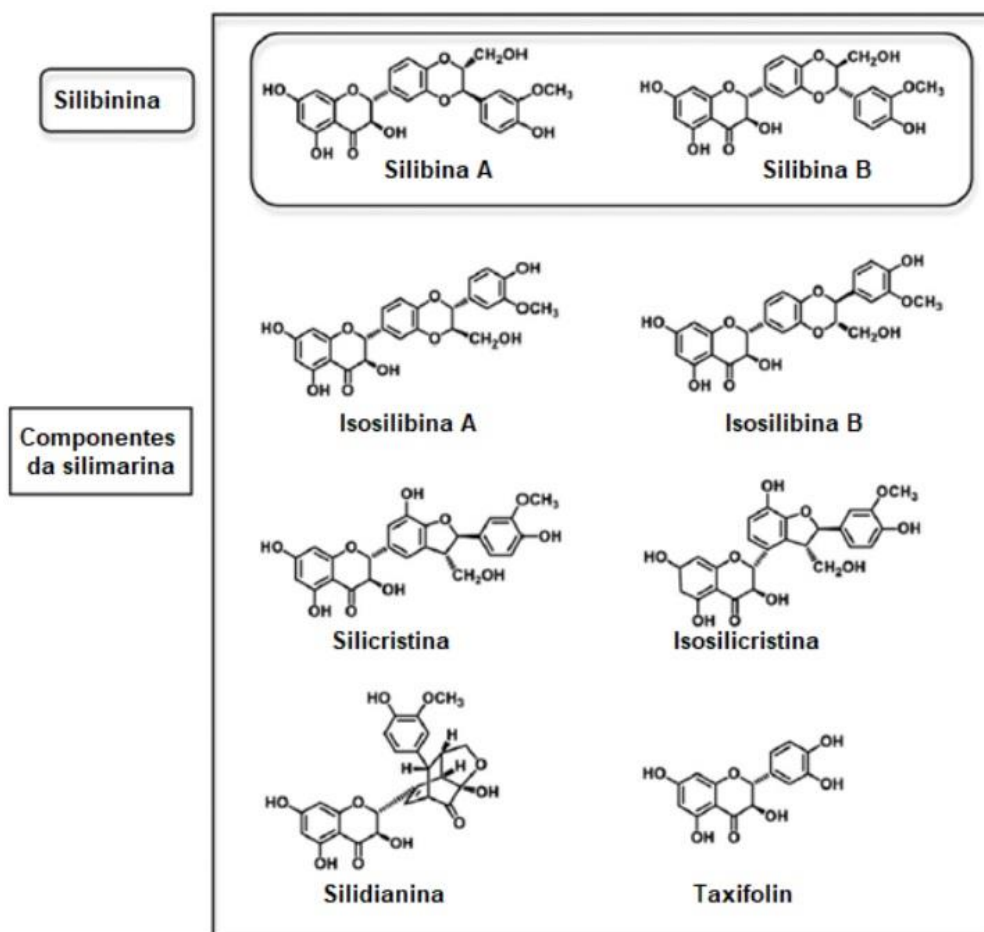
Devido à estreita relação entre a hiperglicemia e o aumento do estresse oxidativo no DM, diversos agentes com propriedades antioxidantes têm sido estudados para avaliação da eficácia clínica na prevenção do desenvolvimento e da progressão de complicações diabéticas (GHASEMI et al., 2019, KAUT et al., 2018, MARLES; FARNSWORTH, 1995, MIRANDA et al., 2018, SILVA et al., 2016).

Dentre as diversas fontes de flavonoides estudadas atualmente, a SMN tem se destacado pelas suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e hepatoprotetoras (CHAMBERS et al., 2017). Devido a suas propriedades, a SMN também tem sido testada, apresentando resultados promissores para outras doenças, tais como doenças neurodegenerativas, osteoporose, DM, sepse, e neoplasias (FEDERICO; DALLIO; LOGUERCIO, 2017, MILIC et al., 2013, VESSAL et al., 2010).

2.6 Silimarina

Originária da região do Mediterrâneo oriental e Norte da África, a SMN é um extrato padronizado obtido dos frutos e das sementes da planta *Silybum marianum*, pertencente à família *Asteraceae*. Popularmente conhecida como “cardo de leite” ou “cardo mariano”, é uma planta resistente e frequentemente invasora, reconhecida por suas propriedades medicinais, principalmente direcionada a desordens hepáticas (KROLL; SHAW; OBERLIES, 2007, TAYOUB; ALORFI, 2018).

O extrato consiste em aproximadamente 65% – 80% de SMN e 20% – 35% de ácidos graxos. A SMN é um composto constituído por flavonoide taxifolina e por sete flavoligninas (silibina A, silibina B, isosilibina A, isosilibina B, silicristina, isosilicristina e silidianina) (POLYAK et al., 2013). Quando foram isolados e caracterizados os principais constituintes da SMN por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), foi revelado que os compostos mais abundantes são as silibinas (silibininas) A e B, seguidas de isosilibinas A e B. As três outras flavonolignananas – isosilicristina, silicristina, silidianina – e o flavonoide taxifolina também foram isolados (PFERSCHY-WENZIG et al., 2014). As estruturas correspondentes aos oito componentes da SMN são mostradas na Figura 1.

Figura 1 – Estrutura e nomenclatura dos principais compostos encontrados na SMN

Fonte: adaptado de Polyak; Ferenci; Pawlotsky, 2013.

As propriedades terapêuticas da SMN se devem às lignanas, consideradas substâncias anti-inflamatórias e antioxidantes, e aos flavonoides, também, considerados substâncias antioxidantes, presentes no composto flavonolignano (TEPONNO; KUSARI; SPITELLER, 2016). Estudos com a SMN demonstram a sua capacidade de eliminar EROs, aumentando a glutaciona intracelular, o que diminui a oxidação lipídica e aumenta a estabilidade da membrana celular (LANI et al., 2015, ZAKARYAN et al., 2017).

A atividade hepatoprotetora e antioxidante da SMN foi demonstrada através do controle de produção de radicais livres, redução da inflamação, proteção contra lesões genômicas, aumento da síntese proteica de hepatócitos, diminuição da atividade de promotores de tumores, quelante de ferro, dentre outras (VARGAS-MENDOZA et al., 2014).

Sabe-se que o fígado é o principal órgão relacionado a processos oxidativos e de detoxificação, representando o órgão que possui a maior expressão da maioria dos antioxidantes enzimáticos como a SOD, CAT e GSH-Px e, em muitas doenças, é primeiramente no fígado que ocorre a elevação dos biomarcadores de estresse oxidativo (STADLER et al.,

2003). Tem sido demonstrado que o DM é a principal causa de distúrbios hepáticos (KHEIRIPOUR et al., 2019), e o potencial protetor da SMN relacionado ao fígado tem sido investigado nos últimos anos (MATTEUCCI et al., 2010).

Sabe-se também que o pâncreas é um órgão essencial no controle metabólico e altamente susceptível a danos oxidativos, por possuir baixa expressão de enzimas antioxidantes (LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996). Neste sentido, substâncias com efeitos antioxidantes, como a SMN, também têm sido estudadas no pâncreas. A SMN tem mostrado resultados positivos no tecido pancreático de ratos diabéticos induzidos por STZ. No estudo de Qin et al. (2017), a ilhota pancreática de ratos tratados com silicristina A, um dos componentes da SMN, apresentou células β parcialmente recuperadas, suprimindo a apoptose induzida por EROs. Além disso, a silicristina A exibiu efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos e níveis aumentados de insulina, sugerindo que a ação hipoglicêmica da silicristina A envolvia a proteção da estrutura e função das células β da ilhota pancreática (QIN et al., 2017).

Diversos estudos vêm sendo conduzidos para avaliar se o tratamento com a SMN atenua as complicações relacionadas ao DM (STOLF; CARDOSO; ACCO, 2017). Observou-se o potencial terapêutico da SMN no DM2 como substância hepatoprotetora e antidiabética através da redução da perda de massa corpórea, estresse oxidativo e lesões hepáticas deletérias e também atenuação da resistência à insulina (KHEIRIPOUR et al., 2019).

Devido ao potencial terapêutico da SMN em diversas doenças e, principalmente, devido as suas propriedades antioxidantes, este trabalho avaliou o possível efeito protetor desse composto em parâmetros metabólicos e marcadores do estado redox sobre o DM1 induzido experimentalmente.

3 JUSTIFICATIVA

O diabetes está associado a maiores taxas de hospitalizações e utilização dos serviços de saúde, o que impacta economicamente no sistema de saúde dos países envolvidos, visto que os indivíduos portadores e suas famílias gastam com insulina, medicamentos e insumos de forma significativa. Tendo em vista o elevado custo relacionado ao diabetes, a doença é um grande desafio para os sistemas de saúde e para o desenvolvimento econômico sustentável (SBD, 2018).

Alterações e/ou defeitos nos processos fisiológicos que normalmente mantêm a homeostase da glicose contribuem para o descontrole glicêmico. Tratamentos coadjuvantes têm sido estudados com a investigação de potenciais efeitos antidiabetogênicos de substâncias químicas derivadas de plantas (DORNAS et al., 2009). Tais substâncias podem oferecer um potencial meio de complementar a terapia insulínica intensiva no DM1, através da modulação de distúrbios fisiológicos resultantes do aumento da formação de espécies reativas e diminuição da capacidade antioxidante (BASHAN; KOVSAN; KACHKO, 2009).

O estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia pode causar graves danos a órgãos como fígado, pâncreas e rins (MALEKINEJAD et al., 2012). Foi demonstrado em estudos anteriores que o papel do pâncreas em modelos de roedores indicam que, no DM1 induzido pela AL, o aumento do estresse oxidativo celular é acompanhado por danos às células pancreáticas e pelo esgotamento da capacidade antioxidante das células (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017). Há também estudos demonstrando o papel das enzimas do citocromo P450, localizadas no fígado e em outros tecidos, e a relação delas com os xenobióticos e medicamentos, incluindo o metabolismo de agentes antidiabéticos e seu papel subsequente na eficácia de agentes terapêuticos (MALEKINEJAD et al., 2012).

Baseado no exposto acima, a nossa hipótese de trabalho é que a SMN exerceria um efeito protetor sobre o desequilíbrio redox, que é comumente observado em ratos diabéticos, e que esse efeito contribuiria para a melhora do controle metabólico e glicêmico destes animais. Sendo assim, os resultados encontrados neste estudo poderão fornecer informações relevantes sobre o possível efeito protetor da SMN no fígado e pâncreas de ratos diabéticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico da SMN na modulação de parâmetros metabólicos e no estado redox em ratas DM1, induzidas por AL.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da SMN em ratas DM1 nos seguintes parâmetros:

- Taxa de sobrevivência;
- Variação de massa corpórea;
- Ingestão alimentar e hídrica;
- Glicemia, triacilgliceróis e perfil renal (ureia e creatinina);
- Atividade de enzimas antioxidantes SOD e CAT no tecido hepático e pâncreas;
- Concentração de proteína carbonilada no tecido hepático e pâncreas;
- Número e área de ilhotas β pancreáticas;
- Quantificação de insulina do tecido pancreático.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais e cuidados éticos

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Fischer, com idade aproximada de 8 semanas e peso médio de 180 gramas, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição (ENUT) da Universidade Federal de Ouro Preto. Todos os animais foram mantidos em gaiolas com temperatura, luminosidade e umidade controladas e receberam água e comida “*ad libitum*”.

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob protocolo nº 6474200418 (ANEXO 1).

5.2 Delineamento experimental

Quarenta e sete animais foram utilizados no experimento e, após indução e confirmação do diabetes (glicemia ≥ 300 mg/dL), foram submetidos aos tratamentos com SMN ou veículo - carboximetilcelulose (CMC) por 30 dias consecutivos, sendo, posteriormente, realizada a eutanásia (Figura 2).

A SMN foi administrada aos animais via gavagem orogástrica nas doses diárias de 50mg/kg/dia (AMNIATTALAB; MALEKINEJAD; REZABAKHSH, 2015) e 100 mg/kg/dia (VESSAL et al., 2010), tendo sido diluída em solução de CMC 0,5% para solubilização (WANG et al., 2017).

Foram utilizados 8 animais para o grupo controle e 13 animais para os grupos diabéticos – considerando a propensão à hipoglicemia após a administração da AL, o que pode levar à morte dos animais diabéticos (FEDERIUK et al., 2004). Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

Grupo controle veículo (C); (n=8 inicial e n=8 final do tratamento): receberam ração comercial para rato e água “*ad libitum*” + 1mL de veículo (CMC) via gavagem orogástrica;

Grupo diabético veículo (D) (n=13 inicial e n=8 final do tratamento): receberam ração comercial para rato e água “*ad libitum*” + 1mL de veículo (CMC) via gavagem orogástrica;

Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia (DS50) (n=13 inicial e n=10 final do tratamento): ração comercial para rato e água “*ad libitum*” + 1mL de suspensão de 50mg/Kg de SMN via gavagem orogástrica;

Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia (DS100) (n=13 inicial e n=8 final do tratamento): ração comercial para rato e água “*ad libitum*” + 1mL de suspensão de 100mg/Kg/dia de SMN via gavagem orogástrica.

Figura 2 – Linha temporal para o delineamento experimental



Fonte: Elaboração própria.

5.2.1 Indução do diabetes

Para indução do diabetes, os animais pertencentes aos grupos D, DS50 e DS100 receberam, após 8 horas de jejum, dose única de injeção intraperitoneal a 135mg/kg de massa corpórea de AL - *Alloxan* - *Sigma-Aldrich*® (St. Louis, Mo.), dissolvida em 0,2 mL de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (MIRANDA et al., 2018; ROSSONI JÚNIOR et al., 2012a). Para o grupo C, os animais receberam, após 8 horas de jejum, 0,2 mL de NaCl a 0,9%.

Posteriormente à indução, foi fornecido aos animais dos grupos D, DS50 e DS100 uma solução de glicose 10%, como única fonte hídrica, por aproximadamente 5 horas, para evitar hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina que ocorre após a destruição das células β pancreáticas (MAZZANTI et al., 2003).

Para confirmação do diabetes, três dias após a injeção de AL, os animais foram submetidos à avaliação dos níveis de glicose capilar, retirando-se uma gota de sangue coletada da cauda. Os níveis de glicose foram aferidos por meio do glicosímetro *Accu-check Active*® (Roche, Mannheim, BD, Germany). Os animais com glicemia superior a 300mg/dL foram considerados diabéticos (MIRANDA et al., 2015).

5.2.2 Eutanásia e coleta do material biológico

Após os 30 dias de tratamento, os animais foram mantidos em jejum de 8 horas e anestesiados, através da inalação por isoflurano - *Isoforine*® (Cristália, Itapira, SP, Brasil). A

eutanásia foi realizada por exsanguinação. O sangue foi coletado através da seção dos vasos sanguíneos da região axilar e armazenado. Em seguida, foi centrifugado a $9.300\times g$ por 15 minutos. O soro obtido foi armazenado em freezer -80°C para realização das análises posteriores de glicemia final de jejum, triacilgliceróis e função renal (ureia e creatinina).

Frações do fígado e pâncreas foram coletados, pesados e armazenados em freezer -80°C para avaliação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT) e da proteína carbonilada. Além disso, um fragmento do pâncreas também foi retirado e armazenado em formaldeído 4% para análises histológicas e imunohistoquímica.

5.3 Análise dos parâmetros bioquímicos do soro

A dosagem dos níveis séricos de glicose, triacilgliceróis, ureia e creatinina foi feita a partir do soro e realizada de acordo com as orientações de protocolos dos kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil).

5.4 Análise das defesas antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo

As dosagens das atividades das enzimas SOD e CAT bem como a quantificação da concentração de proteína carbonilada seguiram os protocolos padronizados no Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM).

5.4.1 Preparo dos homogenatos

Para as dosagens das defesas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo, foram preparados homogenatos do fígado e pâncreas. A atividade de SOD e CAT pode ser realizada com o mesmo homogenato que foi feito a partir da pesagem de 100 mg de tecido hepático e pancreático. Os tecidos foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato 0,1M (pH 7.2), em seguida centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C na rotação de $9.300\times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra para a dosagem da atividade das enzimas.

Para a proteína carbonilada, 200mg de tecido hepático e pancreático foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão KPE (potássio, fosfato e EDTA) e centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C na rotação de $9.300\times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra para o procedimento experimental.

5.4.2 Dosagem de proteínas totais pelo método de Lowry

As proteínas totais foram quantificadas em todos os homogenatos (SOD/CAT e proteína carbonilada), pois foram utilizadas para o cálculo de correção da concentração final das enzimas de defesas antioxidantes e marcadoras de dano proteico.

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Lowry et al. (1951), que se baseia na reação de aminoácidos aromáticos com o reagente de *Folin Ciocalteau*, promovendo sua redução. A reação é catalisada por íons cobre, em meio alcalino, formando uma coloração azulada (LOWRY et al., 1951).

Antes de iniciar a dosagem, foi necessário preparar os reagentes, segundo a descrição abaixo:

- **Reagente A:** 0,25g de sulfato de cobre + 0,5g de citrato de sódio dissolvidos em 100ml de água destilada, armazenados no escuro e à temperatura ambiente;
- **Reagente B:** 5g de carbonato de sódio + 1g de hidróxido de sódio dissolvidos em 250ml de água destilada, armazenados no escuro e à temperatura ambiente;
- **Reagente C:** 1 mL do reagente A em 50 mL do reagente B. Este reagente foi preparado na hora da dosagem;
- **Reagente D:** 1 mL de *Folin Ciocalteau* em 1ml de água destilada. Este reagente foi preparado na hora da dosagem.

Curva padrão de proteínas:

Padrão (2mg/mL) – foi pipetado 53 μ L do padrão de albumina (Kit LABTEST®) e completou-se para 1mL com água destilada.

Padrão (0,2mg/mL) – 100 μ L da solução de 2mg/mL foi pipetada e completou-se com 900 μ L de água destilada.

Tabela 1 - Curva padrão de proteínas

	Padrão 2 mg/mL (μ L)	Padrão 0,2 mg/mL (μ L)	Água destilada (μL)	[] final (mg/mL)
Padrão 1	--	25	75	0,05
Padrão 2	7,5	--	92,5	0,15
Padrão 3	15	--	85	0,3
Padrão 4	25	--	75	0,5
Padrão 5	35	--	65	0,7

Fonte: Caderno de protocolos LBM.

Procedimento:

Após a realização de teste de diluição das amostras, foi pipetado o volume de amostra e água destilada conforme o teste de diluição, sendo que o volume final de cada amostra foi de 100 μ L (Branco:100 μ L de água destilada e todos os outros reagentes). Posteriormente foi adicionado 1 mL do reagente C em todos os tubos. A mistura foi agitada em agitador de tubos e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, 100 μ L do reagente D foi adicionado em todos os tubos. Agitou-se no agitador de tubos novamente e incubou-se por 30 minutos no escuro, em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com o comprimento de onda a 660nm.

Após a leitura, um gráfico foi plotado onde no eixo Y estava representada a concentração do padrão e no eixo X a absorbância do padrão. Foi gerada uma equação da reta para determinação da concentração de proteínas totais nos homogenatos dos tecidos, sendo que as concentrações foram expressas em mg/mL.

5.4.3 Defesas antioxidantes: atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade indireta da enzima SOD foi baseada em estudos de Marklund e Marklund (1974). A dosagem foi realizada em microplaca de Elisa de 96 poços. Inicialmente foram adicionados aos poços 30 μ l de amostra diluída na microplaca, 99 μ l de tampão fosfato 0,1M (pH 7.2), 6 μ l de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) (MTT) *Sigma-Aldrich*® (San Luis, MO), 15 μ l de pirogalol *Sigma-Aldrich*® (San Luis, MO). Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos na estufa a 37°C. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 150 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO). As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de Elisa com o comprimento de onda a 570 nm.

As absorbâncias das amostras foram subtraídas pelo valor do branco, em seguida o valor encontrado foi dividido pela absorbância do padrão e multiplicou-se o valor pelo fator de

diluição. O valor encontrado foi dividido pela quantidade de proteínas encontradas na dosagem do homogenato. A atividade da SOD foi representada em Unidade por miligrama de proteína contido na amostra (U/mg de proteína).

5.4.4 Defesas antioxidantes: atividade da enzima catalase (CAT)

Conforme descrito por Aebi (1984), o método utilizado para dosagem de CAT avalia a atividade da enzima a partir de sua capacidade em converter o H_2O_2 em água e O_2 (AEBI, 1984). Foi realizado um teste de diluição e a partir daí todas as amostras foram diluídas. Uma alíquota de H_2O_2 e do tampão fosfato foram armazenados em gelo para realização do mix utilizado na reação. Foi pipetado 990 μL do mix e 10 μL da amostra. Nesse momento, o cronômetro foi disparado e as absorbâncias foram registradas de 30 em 30 segundos até completar 2 minutos. As leituras foram realizadas em equipamento para leitura ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 240nm. O tampão fosfato 0,1M (pH 7.2) foi utilizado como branco.

1U de CAT é equivalente à hidrólise de 1mmol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). A absorbância utilizada nessa expressão é o delta obtido das duas absorbâncias lidas ($\text{Abs final} - \text{Abs inicial} / 2$). Para o cálculo, foi utilizado o princípio da Lei de Lambert-Beer e aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade (U/L)} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\Delta t} \times \frac{1}{\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}} \times \frac{\text{VT}}{\text{VA}} \times 10^3 \times \text{Fator de diluição}$$

Sendo:

$$\Delta\text{Abs} = \text{Abs inicial} - \text{Abs final}$$

$$\Delta t = 2 \text{ minutos}$$

$$\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2} (240 \text{ nm}) = 40 \text{ L}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$$

$$\text{VT} = \text{Volume total de reação (mL)}$$

$$\text{VA} = \text{Volume de amostra (mL)}$$

$$10^3 = \text{Conversão de } \mu\text{mol para mmol.}$$

Usualmente, a atividade desta enzima é representada em Unidade por miligrama de proteína contida na amostra: U/mg de proteína.

5.4.5 Marcador de estresse oxidativo: proteína carbonilada

Utilizado como medida indireta do dano oxidativo proteico, o biomarcador proteína carbonilada é produzido a partir do processo oxidativo por EROs, que produz grupos carbonila em moléculas de proteína. Métodos sensitivos são comumente utilizados onde 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com grupos carbonílicos gerando hidrazona, sendo essa mensurada através de ensaios espectrofotométricos (LEVINE et al., 1994).

Para essa dosagem, inicialmente 500 µL de amostra biológica (homogenato) foi adicionada a 500 µL de Ácido tricloroacético (TCA) 10% a fim de precipitar as proteínas. Logo depois, os tubos foram agitados e centrifugados a 2.300×g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

Em seguida, foi adicionado ao precipitado 500µL de DNPH e, posteriormente, os tubos foram agitados e incubados no escuro a temperatura ambiente por 1 hora. Durante o tempo de incubação, os tubos foram agitados a cada 15 minutos (0', 15', 30', 45', 60'). Após 1 hora, foram incorporados à mistura 500µL de TCA 10% e, novamente, os tubos foram agitados e levados para serem centrifugados a 2.300×g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado.

O precipitado foi lavado com 1000µL de etanol/ acetado de etila e, em seguida, os tubos foram agitados e novamente centrifugados conforme descrito na etapa anterior. O sobrenadante foi descartado. Este último passo foi repetido duas vezes. Ao final do processo de lavagem, foram adicionados ao precipitado 1000µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%. Posteriormente os tubos foram agitados e centrifugados a 9.300×g por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi utilizado como amostra biológica. As leituras das absorbâncias foram realizadas no espectrofotômetro com o comprimento de onda a 370 nm.

Os resultados são representados em nmol de proteína carbonilada por mg de proteína total. Para o cálculo foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína carbonilada (nmol/mL)} = (\text{abs}/ \epsilon) * (1000000/\text{VA})$$

$$\text{Onde: } \epsilon = 22000 \text{ M. L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}; \text{ VA} = \text{volume da amostra (mL)}.$$

$$\text{Proteína carbonilada por mg de proteína (nmol/mg de proteínas totais)} = \text{proteína carbonilada (nmol/mL)}/\text{proteína total (mg/mL)}$$

5.5 Análise dos parâmetros histopatológicos

As lâminas realizadas para identificação das ilhotas pancreáticas e insulina no tecido pancreático seguiram os protocolos do Laboratório de Morfopatologia da UFOP.

5.5.1 Número e área de ilhotas pancreáticas

Após fixados em solução de formaldeído 4%, os fragmentos de pâncreas de até 4mm de diâmetro foram desidratados em sequência crescente de álcoois e diafanizados em xilol. A próxima etapa consistiu em imergir os cassetes histológicos em parafina. Posteriormente, o tecido pancreático foi emblocado em cassetes com parafina e 5% de cera. Seções parafinadas de aproximadamente 4µm foram obtidas em micrótomo semiautomático. O tecido foi fixado e processado em série decrescente de álcoois e, por fim, as lâminas foram montadas e coradas pela técnica de Hematoxilina & Eosina (H & E), para visualização de danos histológicos.

As análises morfométricas foram feitas no Laboratório Multiusuários do NUPEB. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio óptico Leica acoplado à câmera digital 5000, com o software de análises Leica Application Suite. Foi realizada a contagem morfométrica no software Leica QWin Plus versão 3.0® (Leica Microsystems INC., Buffalo Grove, IL) no qual contou-se o número de ilhotas pancreáticas (ÁVILA et al., 2013; MIRANDA et al., 2015; SILVA et al, 2011a). O software ImageJ® (*National Institutes of Health, NIH*) foi utilizado para contabilizar e aferir a área total de ilhotas presente em cada lâmina corada.

5.5.2 Quantificação de insulina no tecido pancreático

Para realização da quantificação de insulina no tecido pancreático foi realizada a técnica imunohistoquímica, que consiste em um conjunto de métodos que utilizam anticorpos como reagentes específicos. Esses são capazes de identificar e de se ligarem a constituintes teciduais que irão funcionar como antígenos. A ligação estabelecida permite a identificação de diversas substâncias de interesse através da cor estabelecida aos complexos antígeno-anticorpo formados (BORGES, 2014).

Os cortes do tecido pancreático inicialmente parafinados foram desparafinados e hidratados. A primeira etapa da técnica foi a reativação antigênica para exposição dos epítomos que poderiam estar bloqueados devido à utilização de formaldeído para conservação tecidual.

Cada etapa foi seguida de 3 lavagens em *phosphate buffered saline* (PBS) 1x, durante 5 minutos, exceto pós segundo bloqueio. Após essa etapa, foi realizado o primeiro bloqueio referente à peroxidase endógena, que foi feita por incubação com água oxigenada (4%) durante 30 minutos. O segundo bloqueio referente aos sítios inespecíficos foi realizado com leite desnatado Molico® 7% durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti-insulina diluído 1:1000 - I2018-2mL (*Monoclonal Anti-Insulin antibody produced in mouse – clone K36AC10, ascites fluid*), Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo.) e armazenadas em câmara úmida a 4°C *overnight*. Após a incubação, foi realizada a adição do anticorpo secundário biotilado - K0675(11), DAKO® (Carpinteria, CA) e novamente incubado em câmara úmida durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com estreptavidina conjugada à peroxidase DAKO® - K0675(11) (Carpinteria, CA) em câmara úmida durante 30 minutos à temperatura ambiente. As seções foram lavadas em PBS 1 x contendo 3',3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride – 0,005% (DAB) Sigma-Aldrich® (St. Louis, Mo.) e H₂O₂ (0,03%). A revelação foi realizada sob microscopia em aumento de 100X, e as células positivas apresentaram coloração amarronzada.

O software ImageJ® (*National Institutes of Health, NIH*) foi utilizado para mensurar a área total de marcação de insulina presente em cada lâmina corada.

5.6 Análise estatística

A normalidade dos dados foi testada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Os resultados foram apresentados por meio de estatísticas descritivas e expressos em média ± erro padrão ou mediana e intervalo interquartil. Para os dados que seguiram a distribuição normal, foi realizada a análise de variância univariada One-way (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, o pós-teste de Tukey foi realizado. Para avaliação da curva de sobrevida, o teste de Log-rank (Mantel -Cox) foi realizado. Para todas as análises realizadas, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

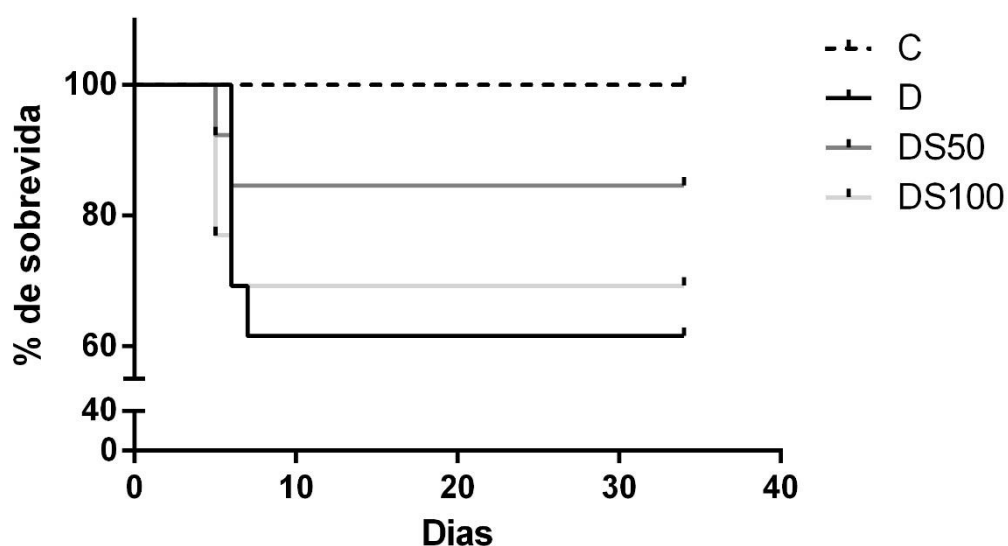
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0® para Windows (GraphPad, San Diego, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Taxa de sobrevivência dos animais

Sabe-se que a progressão e o agravamento do diabetes mellitus tipo 1 sem um tratamento adequado pode diminuir a taxa de sobrevivência dos indivíduos afetados. Sendo assim, no delineamento proposto, foi realizado o acompanhamento da taxa de sobrevivência do grupo C e dos grupos diabéticos, desde a indução do diabetes até o fim do experimento (Figura 3), com o objetivo de averiguar se o tratamento seria eficaz para aumentar a taxa de sobrevivência dos animais diabéticos. Como era de se esperar, 100% dos animais do grupo C sobreviveram. No grupo D, 61,5% dos animais sobreviveram após 30 dias de experimentação, já no grupo diabético que recebeu o tratamento com a dose de 50 mg/Kg/dia (DS50) de SMN, 84,6% dos animais sobreviveram, enquanto no grupo que recebeu o tratamento com a dose de 100 mg/Kg/dia (DS100) de SMN, 69,2% dos animais sobreviveram após 30 dias de experimentação. Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas na taxa de sobrevivência entre o grupo controle e os grupos diabéticos.

Figura 3 – Taxa de sobrevivência dos grupos experimentais após indução do DM1



C – Grupo controle; D – Grupo diabético; DS50 – Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; DS100 – Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia. Foi realizado o teste de Log-rank (Mantel -Cox), não tendo sido verificada diferença estatística entre os grupos avaliados ($p > 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6.2 Avaliação da massa corporal, ingestão alimentar diária e hídrica

A fim de avaliar a perda de massa corpórea, polifagia e a polidipsia, que são sintomas característicos do DM1, bem como avaliar a eficiência da SMN na melhora da sintomatologia do DM1, foram analisados massa corporal, ingestão alimentar e hídrica (Figura 4). No gráfico A, pode-se observar que a massa corporal inicial é igual estatisticamente em todos os grupos experimentais. No gráfico B, observa-se uma redução na massa corporal final entre os grupos diabéticos (D, DS50 e DS100) em comparação ao grupo C. Já no gráfico C, pode-se observar que os grupos diabéticos apresentaram uma maior perda de massa corpórea em relação ao grupo C, sendo que o grupo DS100 teve a menor perda de massa corpórea entre os grupos diabéticos, apesar de não haver diferença estatística entre eles.

O gráfico D apresenta os resultados da ingestão alimentar média dos grupos experimentais. A ingestão alimentar foi obtida subtraindo a pesagem do alimento oferecido do alimento restante na gaiola, sendo observado um aumento do consumo de ração nos grupos D, DS50 e DS100 em relação ao grupo C, mostrando que o tratamento com a SMN em ambas as doses foi capaz de reduzir o consumo alimentar. Além disso, pode-se observar que a ingestão alimentar do grupo DS100 foi estatisticamente igual ao grupo C. Da mesma forma, a ingestão hídrica foi mensurada, observando-se (gráfico E) um aumento do consumo hídrico nos grupos diabéticos em relação ao grupo C e uma redução significativa dos grupos tratados com a SMN em ambas as doses (DS50 e DS100) em relação ao grupo D.

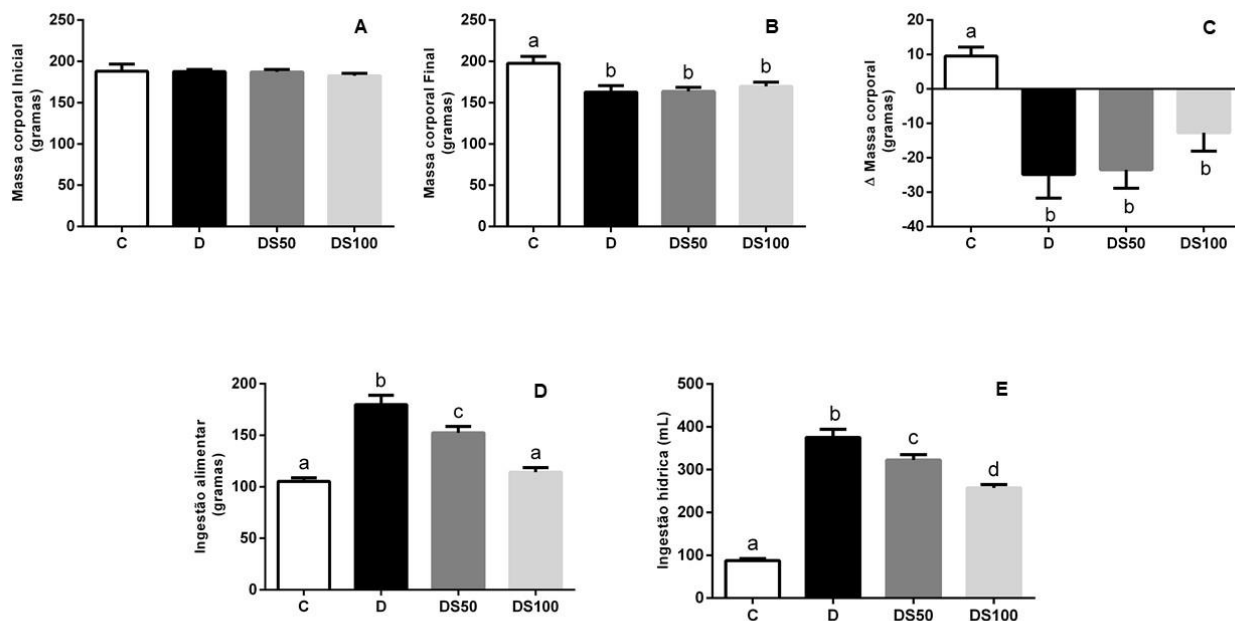
Figura 4 – Avaliação da massa corporal, ingestão alimentar e hídrica

Gráfico A - Massa corporal referente ao início do tratamento em gramas; Gráfico B - Massa corporal ao final do tratamento em gramas; Gráfico C - Variação das massas corporais finais e iniciais entre os grupos, em gramas; Gráfico D - Ingestão alimentar em gramas; Gráfico E - Ingestão hídrica em mL.

C - Grupo controle; D - Grupo diabético; DS50 - Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; DS100 - Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia.

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Foi realizado o teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos

O próximo passo foi avaliar o efeito da SMN sobre a hiperglicemia e hipertrigliceridemia, características do DM1. Além disso, outro fator importante na progressão do DM1 é o agravamento da função renal. Sendo assim, também foram realizadas as dosagens de ureia e creatinina (Figura 5). Ao analisar a glicemia (gráfico A), observou-se, como esperado nesse modelo, que os grupos diabéticos apresentaram um aumento significativo desse parâmetro em comparação ao grupo C. Observou-se ainda que nenhum dos tratamentos (DS50 e DS100), a SMN foi eficaz para reduzir o estado hiperglicêmico. O mesmo perfil foi observado nos resultados apresentados nos gráficos B e C, quando os triacilgliceróis e ureia foram analisados, respectivamente. No gráfico D, pôde-se observar que houve um aumento na concentração de creatinina no grupo D em relação ao grupo C. Nos grupos tratados com a SMN, DS50 e DS100, observou-se uma redução significativa na concentração desse parâmetro a valores similares ao grupo C, indicando um possível efeito protetor do tratamento.

Figura 5 - Avaliação de parâmetros bioquímicos: glicemia, triacilgliceróis, ureia e creatinina

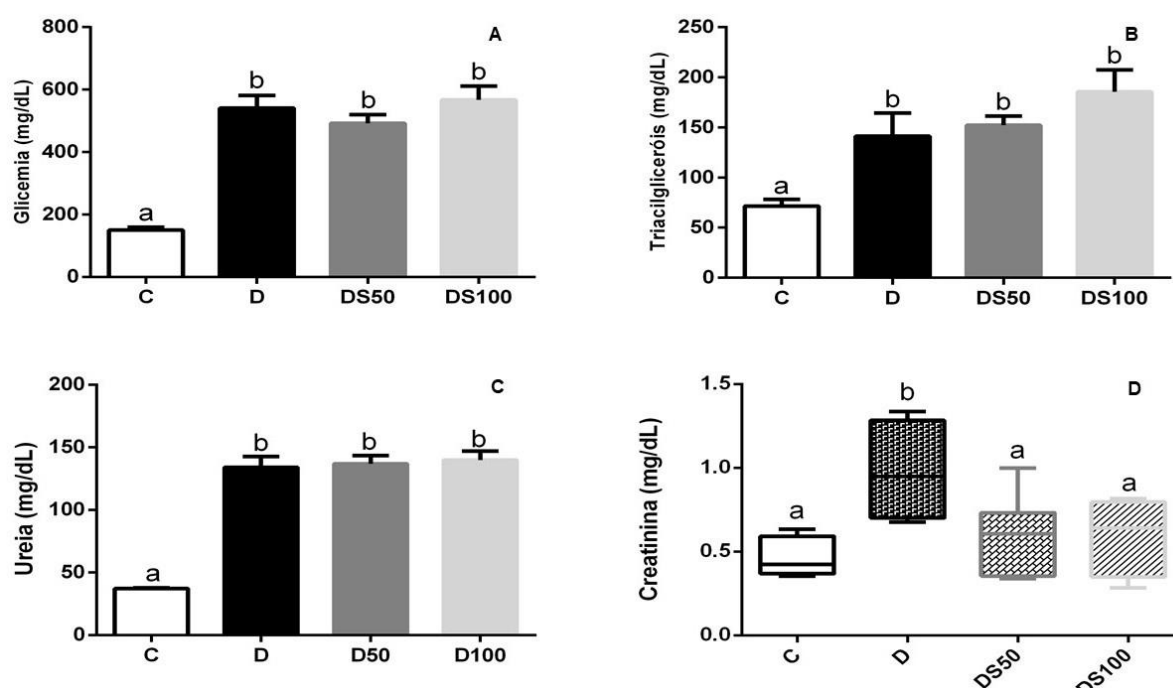


Gráfico A - Glicemia em mg/dL; Gráfico B - Triacilgliceróis em mg/dL; Gráfico C - Ureia em mg/dL; Gráfico D - Creatinina em mg/dL.

C - Grupo controle; D - Grupo diabético; DS50 - Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; DS100 - Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia.

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Foi realizado o teste ANOVA-oway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para as análises de glicemia, triacilgliceróis e ureia. Para análise de creatinina, foi realizado o teste ANOVA-oway, seguido pelo pós-teste de Tukey. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6.4 Efeito do tratamento com a silimarina nos marcadores do estado redox hepático

Para avaliar se a indução do diabetes e o tratamento com a SMN modificou o perfil antioxidante no tecido hepático, avaliou-se a atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT. Os resultados apresentados no gráfico A da figura 6 mostram um aumento significativo da atividade de SOD nos grupos D, DS50 e DS100 em relação ao grupo C. Quando a CAT foi avaliada (gráfico B), o que se observou foi uma redução significativa na atividade desta enzima nos grupos D, DS50 e DS100, quando comparados ao grupo C. Em relação ao dano oxidativo às proteínas no tecido hepático, foi realizada a avaliação da proteína carbonilada. Com os resultados apresentados no gráfico C, observou-se um aumento significativo da concentração desse biomarcador no grupo D em relação ao grupo C, sendo que o tratamento com a SMN foi eficaz na redução dos danos oxidativos em proteínas, sugerindo que a SMN pode amenizar os danos oxidativos causados às proteínas pelo DM.

Figura 6 – Avaliação do perfil antioxidante (Superóxido dismutase e Catalase) e do dano oxidativo em proteínas (Proteína Carbonilada) no tecido hepático

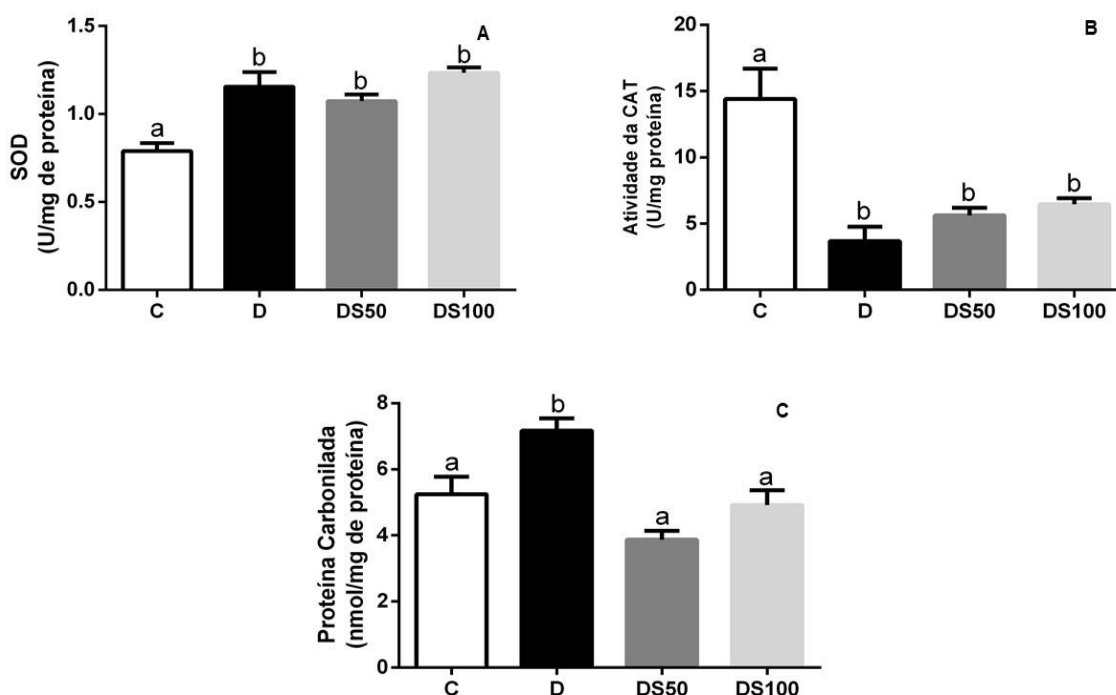


Gráfico A - SOD em U/mg de proteína; Gráfico B – Atividade de CAT em U/mg de proteína; Gráfico C – Proteína Carbonilada em nmol/mg de proteína.

C – Grupo controle; D – Grupo diabético; DS50 – Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; DS100 - Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Foi realizado o teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós- teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

6.5 Efeito do tratamento com a silimarina sobre marcadores do estado redox pancreático

O perfil antioxidante no tecido pancreático também foi avaliado para verificar se a indução do diabetes e o tratamento com a SMN conseguiriam amenizar os danos causados pelo diabetes. Para isso, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT foi avaliada. O gráfico A (Figura 7) demonstra uma redução significativa da atividade de SOD nos grupos D, DS50 e DS100 em relação ao grupo C. O mesmo perfil foi observado em relação aos resultados da CAT, apresentados no gráfico B, onde se observou uma redução significativa desse parâmetro nos grupos D, DS50 e DS100 quando comparados ao grupo C. Em relação à dosagem de proteína carbonilada (gráfico C), observou-se um aumento significativo da concentração da proteína carbonilada no grupo D em relação ao grupo C, sendo que o tratamento com a SMN, em ambas as doses (DS50 e DS100), reduziu os danos oxidativos às proteínas, retornando-os a valores estatisticamente iguais ao grupo C.

Figura 7 – Avaliação do perfil antioxidante (Superóxido dismutase e Catalase) e do dano oxidativo em proteínas (Proteína Carbonilada) no tecido pancreático

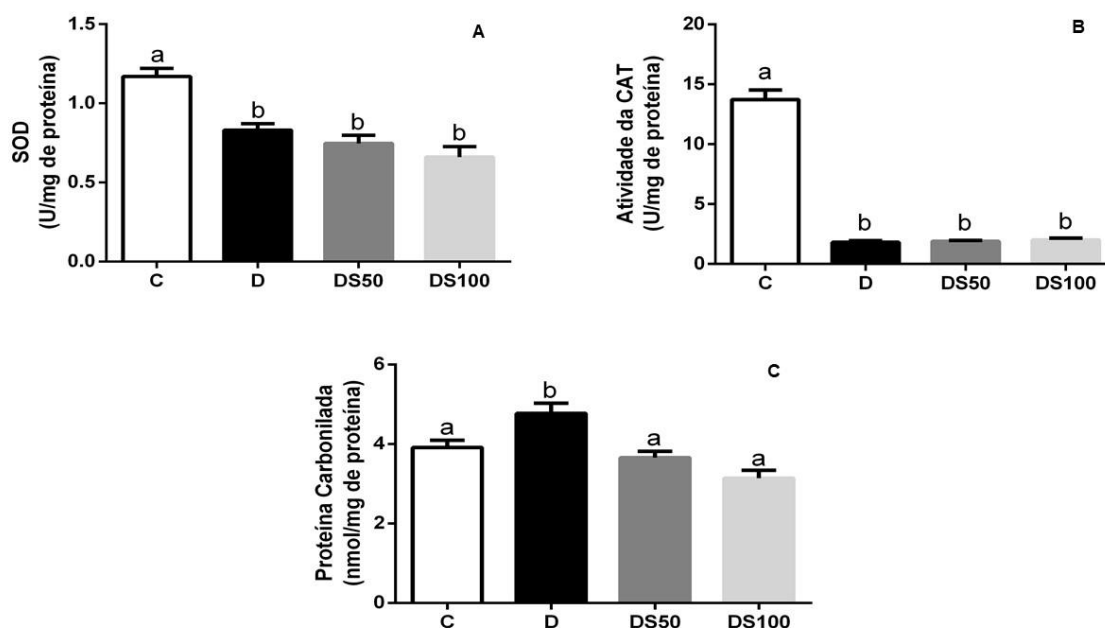


Gráfico A - SOD em U/mg de proteína; Gráfico B – Atividade de CAT em U/mg de proteína; Gráfico C – Proteína Carbonilada em nmol/mg de proteína. C – Grupo controle; D – Grupo diabético; DS50 – Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; DS100 - Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. Foi realizado o teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ($p < 0,05$).

Fonte: Elaboração própria.

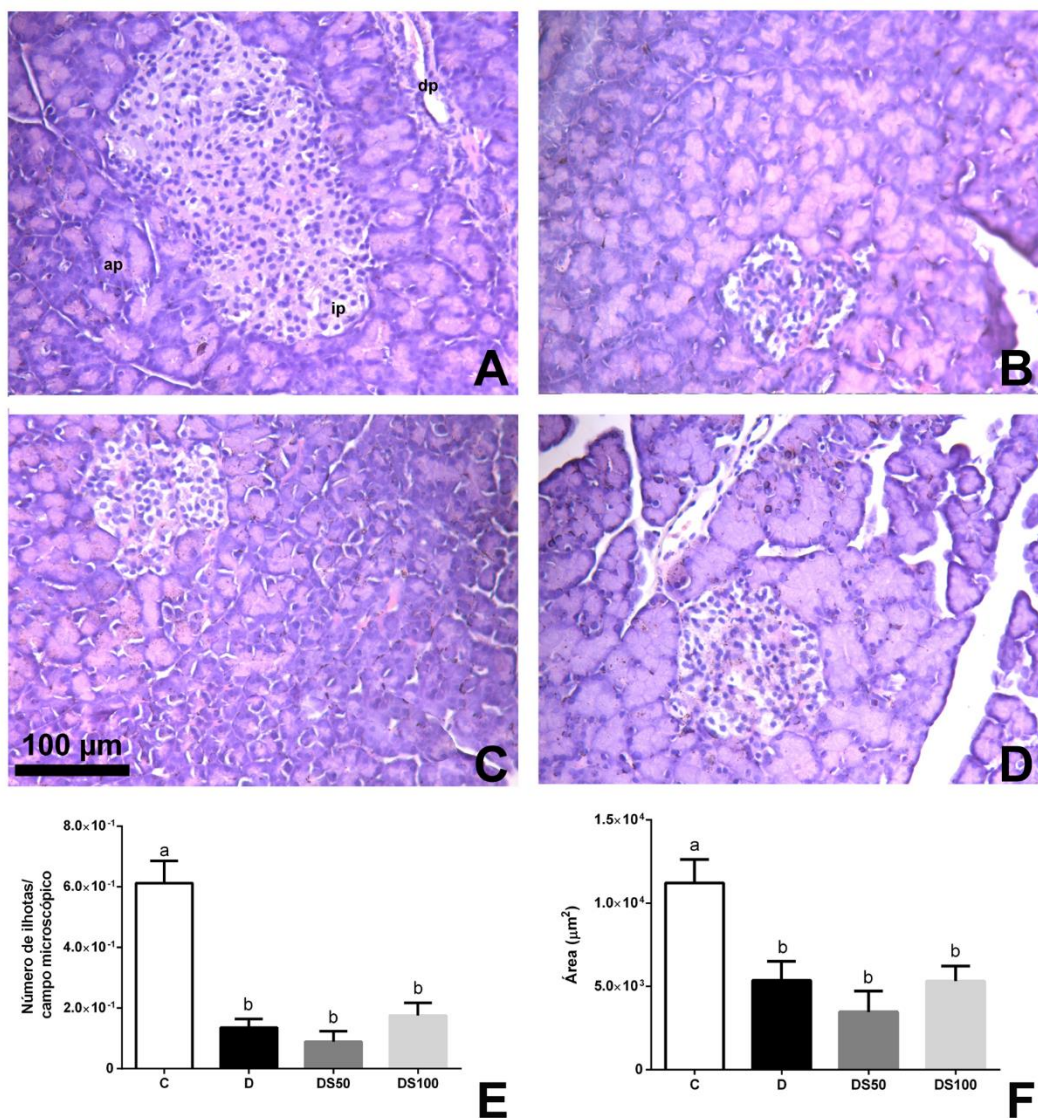
6.6 Análise histopatológica

6.6.1 Número e área de ilhotas pancreáticas

Em relação à análise histopatológica, primeiramente foram avaliados o número e a área das ilhotas pancreáticas. A figura 8 apresenta as fotomicrografias da avaliação histológica em microscopia óptica representativas dos tecidos pancreáticos corados em Hematoxilina e Eosina (H&E) dos grupos C (painel A), D (painel B), DS50 (painel C) e DS100 (painel D). Não foi observada alteração significativa na histoarquitetura do tecido pancreático em nenhum dos grupos experimentais. De forma geral, o quadro histológico encontrado foi compatível com a normalidade do tecido, não tendo sido observadas áreas de morte celular (necrose ou apoptose), áreas degenerativas, fibróticas ou sinais inflamatórios, tanto nos componentes acinares quanto nas ilhotas pancreáticas de nenhum dos animais dos grupos experimentais.

Em relação ao número (gráfico E) e à área (gráfico F) das ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais, observou-se uma redução no número e na área das ilhotas nos grupos diabéticos (D, DS50 e DS100) em relação ao grupo C.

Figura 8 – A SMN não aumenta o número ou área de ilhotas pancreáticas



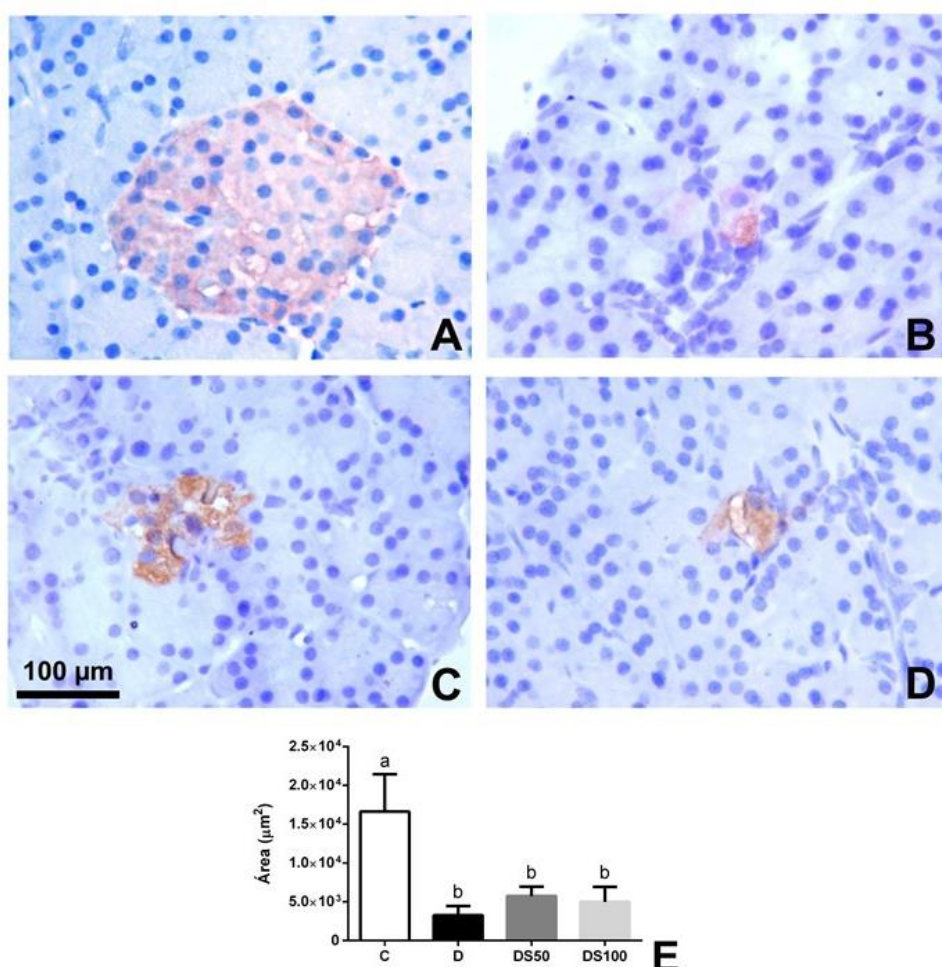
Fotomicrografias representativas de seções parafinadas do pâncreas de animais controle e experimentais, coradas por H&E (A-D): Grupo controle (A) com arquitetura normal de ilhota pancreática; Grupo diabético (B) e Grupos diabéticos tratados com SMN 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia respectivamente (C e D) apresentando áreas de ilhotas pancreáticas reduzidas. Nas fotomicrografias, “ip” indica ilhota pancreática, “dp” indica ducto pancreático e “ap” indica ácino pancreático. Barra de escala: 100µm. Gráficos das análises morfométricas (E-F): (E) Número de ilhotas pancreáticas. (F) Área de ilhotas pancreáticas. Nos gráficos, “C” Grupo controle; “D” Grupo diabético; “DS50” Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; “DS100” Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Foi realizado teste ANOVA-oway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

Fonte: Elaboração própria.

6.6.2 Quantificação de insulina no tecido pancreático

Em relação à quantificação de insulina, foi revelada imunomarcção positiva com anticorpo anti-insulina em seções histológicas de ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais (Figura 9 A- D). Nos animais dos grupos D, DS50 e DS100, a quantificação imunohistoquímica das ilhotas pancreáticas relativa à área e à densidade de insulina foi significativamente menor, quando comparada ao grupo C (Gráfico E e F).

Figura 9 – A SMN não aumenta a biossíntese de insulina nas ilhotas pancreáticas



Fotomicrografias representativas de seções parafinadas do pâncreas de animais controle e experimentais, corados por imunohistoquímica, com anticorpo anti-insulina (diluído 1:1000) (A-D): Grupo controle (A) mostrando imunomarcção normal para insulina; grupo diabético (B) e grupos diabéticos tratados com SMN 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia respectivamente (C e D), apresentando pouca imunomarcção de insulina. Nas fotomicrografias, “ip” indica ilhota pancreática, “dp” indica ducto pancreático e “ap” indica ácino pancreático. Barra de escala: 100µm. Gráficos das análises morfométricas (E-F): (E) Área de ilhotas pancreáticas e (F) Densidade de insulina nas ilhotas pancreáticas. Nos gráficos, “C” Grupo controle; “D” Grupo diabético; “DS50” Grupo diabético + SMN 50mg/kg/dia; “DS100” Grupo diabético + SMN 100mg/kg/dia. Os dados foram expressos como média ± erro padrão. Foi realizado teste ANOVA-oneway, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p<0,05).

Fonte: Elaboração própria.

7 DISCUSSÃO

O estudo do potencial antidiabético de compostos e extratos de plantas é muito utilizado em modelos experimentais de DM induzido por drogas, sendo a AL uma das drogas mais utilizadas, visto que suas propriedades químicas inibem seletivamente a secreção de insulina estimulada por glicose. Além disso, a formação de EROs provoca a necrose seletiva de células β , ambos os efeitos resultam coletivamente em um estado fisiopatológico de diabetes dependente de insulina ou DM1 (IGHODARO; ADEOSUN; AKINLOYE, 2017).

Os animais diabéticos receberam uma dose única de 135mg/kg de AL, o que, de acordo com a literatura (MIRANDA et al., 2015, 2018), mostrou-se seguro e eficaz na indução e na manutenção do quadro diabetogênico. Diversos fatores podem interferir nos efeitos diabetogênicos da droga, o que pode levar ao não estabelecimento do quadro diabético ou provocar a morte dos animais em questão (SILVA; NOGUEIRA, 2015).

Neste estudo, após indução do diabetes com a AL, houve uma maior mortalidade no grupo D em relação aos tratados com SMN. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos diabéticos e controle. Dessa forma, o experimento foi conduzido com baixo índice de mortalidade e boas condições experimentais.

A caracterização do DM1 foi suportada por alterações clínicas claras e bem definidas. Em relação à evolução da massa corpórea ao longo do experimento, observou-se, em relação ao grupo C, uma redução da massa corpórea dos animais dos grupos D, DS50 e DS100. Nos animais do grupo D, esse evento era esperado, entretanto, os tratamentos com a SMN não foram eficientes no reestabelecimento da massa corpórea. Lerco et al. (2003) também verificaram, no estudo deles a respeito da caracterização de modelo experimental de DM induzido por AL, uma redução da massa corpórea (LERCO et al., 2003).

A condição patológica associada ao DM1 faz com que o organismo se comporte como se sempre estivesse no estado de jejum, ou seja, devido à falta da produção insulínica e a não utilização de glicose como substrato energético, o organismo atua de modo catabólico, mobilizando triacilgliceróis do tecido adiposo e aumentando a oxidação parcial de ácidos graxos com a subsequente produção de corpos cetônicos no fígado, além da mobilização de proteínas musculares para a síntese de glicose hepática, através da gliconeogênese (NELSON; COX, 2014).

Devido à utilização de ácidos graxos, proteínas celulares e a não utilização de glicose advinda do aporte alimentar, o organismo intensifica o consumo de alimentos para tentar suprir a carência energética. Com isso, há um aumento do consumo alimentar que, neste estudo, a

SMN conseguiu reduzir nos dois grupos de tratamento, DS50 e DS100, sendo mais pronunciado no grupo DS100, em relação ao grupo D. Não conseguimos encontrar estudos que possam justificar a redução da ingestão alimentar, observada nos animais diabéticos tratados com a SMN. Entretanto podemos levantar a hipótese de que a SMN possa aumentar os níveis do hormônio incretina denominado *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), responsável pelo retardamento do esvaziamento gástrico e aumento da saciedade (ANDERSEN et al., 2018). Mas, para suportar tal hipótese, devemos conduzir estudos futuros para quantificar os níveis deste hormônio em animais tratados com a SMN.

O maior consumo de alimentos e a deficiência insulínica promovem a hiperglicemia, o que ocasiona um aumento da concentração de glicose no glomérulo renal, provocando uma diurese osmótica e desidratação (LERCO et al., 2003), o que justificaria a polidipsia observada em nosso estudo nos animais do grupo D. O tratamento com a SMN em ambas as doses conseguiu atenuar a polidipsia, mas sem alterar a hiperglicemia dos animais diabéticos. Neste estudo, não conseguimos esclarecer o mecanismo pelo qual o tratamento com a SMN foi capaz de atenuar a ingestão hídrica dos animais. Entretanto podemos inferir que a SMN possa interferir com o eixo hipotalâmico responsável pelo controle da sede (SIVUKHINA; JIRIKOWSKI, 2016), através da modulação do hormônio antidiurético. Porém, para confirmar esta hipótese, mais experimentos devem ser realizados.

Diversos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de investigar o potencial antioxidante de plantas medicinais na tentativa de minimizar o estresse oxidativo e as complicações diabéticas (FALLEH et al., 2008; KUMAR; PANDEY, 2013). Neste cenário, a SMN possui propriedades antioxidantes, podendo ser considerada promissora no combate ao estresse oxidativo e na indução de efeitos positivos nas complicações metabólicas relacionadas ao DM (STOLF; CARDOSO; ACCO, 2017).

A indução do DM1, através da administração da AL, resultou em uma hiperglicemia, hipertrigliceridemia e prejuízo na função renal dos animais diabéticos. A hiperglicemia, hipertrigliceridemia e ureia foram mantidas nos animais tratados (DS50 e DS100), uma vez que a SMN não se mostrou eficaz para reduzir esses parâmetros. Em estudo conduzido por Vessal, et al., (2010), não houve também redução da glicemia e dos níveis de ureia e, embora essa última tenha apresentado melhora quando comparada ao grupo diabético não tratado, esta redução não amenizou o dano renal (VESSAL et al., 2010). Em nosso trabalho, apesar de o tratamento com a SMN não ter sido capaz de diminuir os níveis séricos de ureia, foi capaz de normalizar os valores de creatinina sérica. Os níveis séricos de creatinina também foram avaliados por Tuorkey, et al. (2015), em um modelo experimental de diabetes tipo 2, no qual

foi observada uma redução dos níveis deste metabólito com o tratamento com a SMN na dose de 120mg/Kg/dia durante 10 dias (TUORKEY; EL-DESOUKI; KAMEL, 2015).

Não foi observado também em nosso estudo um efeito significativo da SMN nas doses de tratamento testadas em relação aos triacilgliceróis. Em uma metanálise, realizada por Hadi et al., (2018), não foram observados efeitos significativos da suplementação com SMN nas concentrações totais de colesterol ou triacilgliceróis, sugerindo não haver evidências suficientes para concluir a eficácia da suplementação com SMN no DM2 em humanos (HADI et al., 2018).

Embora outros estudos relacionados a flavonoides tenham demonstrado efeitos hipoglicêmicos em modelos experimentais, ainda há controvérsias sobre a eficácia destes metabólitos secundários na regulação glicêmica e metabólica em modelos experimentais de diabetes, e parte destas inconsistências podem ser justificadas pelas diferenças encontradas nas doses, formas de administração e tempo de tratamento utilizados nos diferentes estudos (AMNIATTALAB; MALEKINEJAD; REZABAKHSH, 2015; AVILA et al., 2013; MALEKINEJAD et al., 2012; SOTO et al., 2004).

Considerado um órgão de importância metabólica central e desempenhando um papel fundamental na homeostase da glicose e metabolismo proteico e lipídico, o fígado é responsável por processos de oxidação e desintoxicação que ocorrem nos estágios iniciais de muitas doenças, incluindo diabetes, sendo esse frequentemente associado à disfunção hepática (PATCHE et al., 2017). É bem elucidado que a indução do DM1 com a AL aumenta a formação de EROs, a expressão do transportador de glicose (GLUT-2) em outros órgãos, como células tubulares e hepatócitos, o que explica porque as toxinas da AL podem causar danos aos rins e fígado (LENZEN, 2008a).

Nossos resultados mostraram um desequilíbrio na atividade das enzimas SOD e CAT hepáticas, o que culminou no aumento de proteína carbonilada no grupo D. Sabe-se que o dano oxidativo pode estimular a expressão de enzimas antioxidantes na tentativa de minimizar o desequilíbrio redox. Em fígado de camundongos diabéticos, foi observado que a hiperglicemia pode aumentar a expressão de enzimas antioxidantes, mas prejudica suas atividades correspondentes, o que possibilita danos aos tecidos mediados por EROs (FRIGUET, 2006).

Em nosso estudo foi observado um aumento na atividade de SOD acompanhado de uma redução na atividade de CAT hepática, o que pode ter ocorrido pela inativação parcial ou completa desta enzima devido ao processo de glicação enzimático (BAKALA et al., 2012). Patche et al. (2017) observaram que, diferentemente da atividade da CAT, a atividade da Mn-SOD ou SOD2 hepática não era afetada pelo processo de glicação e, por esta razão, uma maior atividade da SOD2 no fígado de camundongos diabéticos foi observada (PATCHE et al., 2017).

Sendo assim, uma resposta adaptativa do fígado ao estresse oxidativo, demonstrado pelo aumento de SOD, pode ter ocorrido (ATAIHIRE; NWANGWA; IGWEH, 2019), já que essa enzima é uma das primeiras linhas de defesa antioxidante e o fígado é um órgão com capacidade adaptativa para responder a diferentes xenobióticos (KARIMI et al., 2011). Entretanto, apesar de o aumento na atividade de SOD não ter sido acompanhado pela atividade de CAT, ainda assim, a SMN foi capaz de reduzir o dano proteico nas duas doses de tratamento (DS50 e DS100), provavelmente por um mecanismo independente da atividade de CAT. Malekinejad et al. (2012) observaram que o tratamento de ratos diabéticos com 50 mg/kg de SMN por 28 dias foi capaz de reduzir o estresse oxidativo hepático, refletido pela redução dos níveis de malondialdeído e aumento da GSH-Px (MALEKINEJAD et al., 2012). Possivelmente mecanismos envolvidos no aumento da GSH-Px podem estar envolvidos na proteção mediada por SMN contra o dano proteico. Vargas-Mendoza et al. (2014) descreveram os efeitos hepatoprotetores da SMN, mostrando que ela pode auxiliar na manutenção da integridade da membrana dos hepatócitos, o que impede a entrada de substâncias tóxicas ou xenobióticos. A SMN, devido à sua natureza fenólica, é capaz de doar elétrons para estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), além de aumentar o conteúdo de glutathiona intracelular, impedindo a lipoperoxidação das membranas (KARIMI et al., 2011; VARGAS-MENDOZA et al., 2014).

O pâncreas, mais especificamente as células beta pancreáticas, estão entre o órgão/células metabolicamente mais ativos do corpo humano, sendo altamente dependentes do metabolismo oxidativo para a síntese de ATP (SEKINE et al., 1994). Apesar da alta atividade metabólica e consequente produção de espécies reativas como subproduto da respiração mitocondrial (LELOUP et al., 2009), as enzimas antioxidantes pancreáticas são expressas quantitativamente em níveis muito menores do que em outros tecidos (LENZEN, 2008b, LENZEN; DRINKGERN; TIEDGE, 1996).

No tecido pancreático do presente estudo observou-se uma redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT nos grupos diabéticos (D, DS50 e DS100). Entretanto apenas o grupo D apresentou um aumento do dano proteico. Como observado no tecido hepático, a SMN conseguiu reduzir a carbonilação das proteínas nas duas doses de tratamento (DS50 e DS100), por um mecanismo independente da atividade de SOD e CAT e, provavelmente, dependente do ciclo redox da glutathiona. Frenkel et al. (2018) mostraram que a administração de N-Acetyl-L-Cysteine (NAC) promoveu um aumento na GSH-Px do pâncreas de camundongos diabéticos sem alterar a atividade de outras enzimas antioxidantes, diminuindo, assim, o estresse oxidativo no tecido pancreático (FRENKEL et al., 2018).

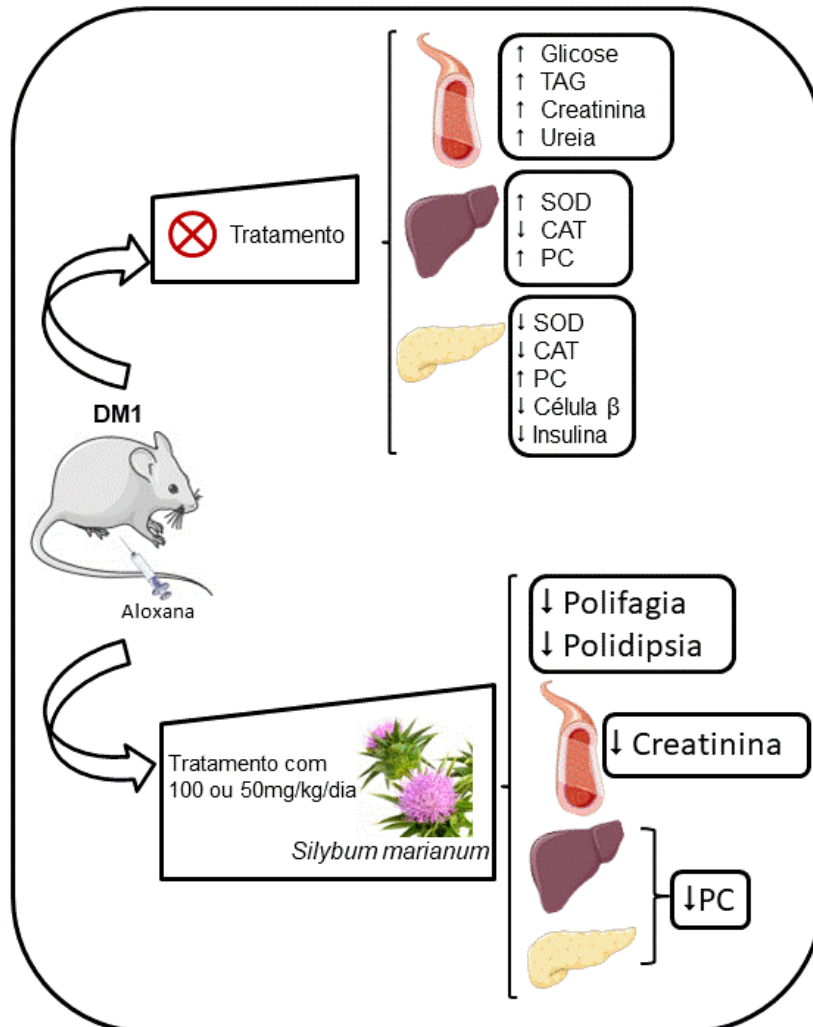
As células beta pancreáticas são essenciais para a manutenção da homeostase da glicose, o que é detectado por meio dos níveis elevados de glicemia sanguínea, levando à subsequente produção e liberação de insulina (WANG; WANG, 2017). Em nosso estudo, os animais diabéticos (D, DS50 e DS100) apresentaram uma redução significativa no número e na área de ilhotas pancreáticas, corroborando a análise relacionada à diminuição na biossíntese de insulina e à hiperglicemia persistente, após o período de tratamento com ambas as doses.

Estudos em modelos de roedores com DM1 induzida por AL sugerem que a SMN na dose de 200mg/kg/dia por 9 semanas foi capaz de desempenhar um papel molecular importante na recuperação estrutural e funcional do pâncreas, quando comparado ao grupo controle sem tratamento com a SMN (SOTO et al., 2004). Em outro estudo, de Qin et al. (2017), observou-se um efeito hipoglicêmico da silicristina A, um componente isolado da SMN, em ratos DM1, o que não corrobora com nossos resultados, quando avaliamos o efeito da SMN na regulação glicêmica. Podemos inferir, tendo em vista nossos resultados, que diferenças relacionadas à dose e tempo de tratamento e/ou também ao isolamento de um componente específico da SMN possam agir de forma mais eficaz na regulação glicêmica (QIN et al., 2017).

A SMN mostrou-se parcialmente eficaz na redução do insulto hepático e pancreático, mesmo em condições hiperglicêmicas. Apesar de alguns estudos demonstrarem o efeito anti-hiperglicêmico dos flavonoides (AMNIATTALAB; MALEKINEJAD; REZABAKHSH, 2015; EL-FAR et al., 2016; SOTO et al., 2004), há muitas controvérsias a esse respeito. Isto pode ser justificado pelas diferenças observadas no preparo dos extratos de plantas medicinais, nas doses e nos tempos de tratamento utilizados nos diferentes estudos.

Neste sentido, podemos inferir que as duas doses de SMN utilizadas neste estudo foram eficazes para reduzir parcialmente o dano hepático e pancreático de forma independente da regulação glicêmica (Figura 10), ou seja, sem alterar a produção pancreática de insulina e o estado hiperglicêmico dos animais.

Figura 10 – Efeito da SMN no estado redox hepático, pancreático e regulação metabólica de um modelo experimental de diabetes tipo 1



O tratamento com SMN reduziu a polifagia, polidipsia, a creatinina sérica e proteína carbonilada no tecido hepático e pancreático nas duas doses de tratamento avaliadas em um modelo experimental de diabetes tipo 1 induzido por AL. (↑) Aumentou, (↓) Diminuiu, (TAG) Triacilgliceróis, (PC) Proteína carbonilada.

Fonte: Elaboração própria.

8 CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa sugerem que o tratamento com a SMN apresentou uma melhora dos sintomas diabéticos relacionados à polifagia e à polidipsia, além de melhorar parcialmente a função renal e proteger o fígado e pâncreas contra o dano proteico, mesmo sem alterar o estado hiperglicêmico e a função das células beta em animais diabéticos. Além disso, pode-se concluir que a SMN não apresentou diferença de eficácia entre as duas doses de tratamento testadas.

9 LIMITAÇÕES

O tratamento com a SMN foi iniciado após a destruição quase total das células beta pancreáticas pela AL, o que pode ter dificultado a ação benéfica da SMN. Além do mais, estudos futuros deveriam ser realizados para avaliar o efeito da SMN sobre o ciclo redox da glutationa e os níveis do hormônio GLP-1, para que possamos confirmar ou refutar as hipóteses levantadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, ADA Clinical Practice Recommendations. **Diabetes Care**, v. 36, n. Supplement 1, p. S67–S74, 2013. Disponível em: https://care.diabetesjournals.org/content/36/Supplement_1/S67. Acesso em: 10 jan. 2019.

ADA. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care. In: Diabetes 2018. **Diabetes Care**, v. 41, n. January, p. S13–S27, 2018. Disponível em: https://care.diabetesjournals.org/content/diacare/41/Supplement_1/S13.full.pdf. Acesso em: 10 jan. 2019.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 106–121, 1984.

AL-AWAR, A. et al. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4993915/>. Acesso em: 12 dez. 2018.

AMNIATTALAB, A.; MALEKINEJAD, H.; REZABAKHSH, A. Silymarin : A Novel Natural Agent to Restore Defective Pancreatic β Cells in Streptozotocin (STZ) -induced Diabetic Rats. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. November 2014, p. 493–500, 2015.

AMORIM, R. G. et al. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 112, n. 5, p. 577–587, 1 maio 2019.

ANDERSEN, A. et al. Glucagon-like peptide 1 in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 7, p. 390–403, 2018.

ARAUJO, C. M. et al. Morus nigra leaf extract improves glycemic response and redox profile in the liver of diabetic rats. **Food and Function**, v. 6, n. 11, p. 3490–3499, 2015.

ATAIHIRE, J. U.; NWANGWA, E. K.; IGWEH, J. C. Modulations in Anti-Oxidant Activities of Selected Gastro-Intestinal Tissues in Alloxan-Induced, Silymarin Treated Diabetic Wistar Rats. **Open Journal of Gastroenterology**, v. 09, n. 05, p. 73–90, 2019. Disponível em: https://file.scirp.org/pdf/OJGas_2019053011071335.pdf. Acesso em: 10 out. 2019.

AVILA, D. de L. et al. Vildagliptin Ameliorates Oxidative Stress and Pancreatic Beta Cell Destruction in Type 1 Diabetic Rats. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 194–202, 2013. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/4184/1/ARTIGO_VildagliptinAmelioratesOxidative.pdf. Acesso em: 10 ago. 2019.

BABU, N. R. Studies on the evaluation of antidiabetic and antioxidant activities using some selected medicinal plants. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 4, n. 2, p. 21–24, 2016. Disponível em: <http://www.florajournal.com/archives/2016/vol4issue2/PartA/4-2-12.pdf>. Acesso em: 15 set. 2019.

BAKALA, H. et al. Catalase, a target of glycation damage in rat liver mitochondria with aging.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, v. 1822, n. 10, p. 1527–1534, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912001329?via%3Dihub>. Acesso em: 15 out. 2019.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao, Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, jul. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2018.

BASHAN, N.; KOVSAN, J.; KACHKO, I. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. **Rev. Physiology**, v. 89, p. 27–71, 2009. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.00014.2008>. Acesso em 10 out. 2018.

BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, 1991.

BORGES FERRO, A. **Imunohistoquímica**. Lisboa: Borges Ferro, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ipl.pt/bitstream/10400.21/4569/1/Imunohistoqu%C3%ADmica.pdf>. Acesso em: 15 maio 2019.

BOUDERBALA, S. et al. Iridoid extracts from *Ajuga reptans* increase the antioxidant enzyme activities in red blood cells of rats fed a cholesterol-rich diet. **Nutrition Research**, v. 30, n. 5, p. 358–365, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531710000783>. Acesso em: 15 set. 2018.

CERIELLO, A.; TESTA, R.; GENOVESE, S. Clinical implications of oxidative stress and potential role of natural antioxidants in diabetic vascular complications. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 4, p. 285–292, abr. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939475315300958>. Acesso em: 10 fev. 2019.

CHAMBERS, C. S. et al. The silymarin composition... and why does it matter??? **Food Research International**, v. 100, p. 339–353, 2017.

CHEON, C. K. Understanding of type 1 diabetes mellitus: what we know and where we go. **Korean J Pediatr**, v. 61, n. 10, p. 307–314, 2018. Disponível em: <https://kjp.or.kr/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2018.06870>. Acesso em: 20 nov. 2018.

DALLAQUA, B.; DAMASCENO, D. C. Comprovação do efeito antioxidante de plantas medicinais utilizadas no tratamento do Diabetes mellitus em animais: artigo de atualização. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 13, n. 3, p. 367–373, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13n3/a17v13n3>. Acesso em: 10 jul. 2018.

DARMAUN, D. et al. Poorly controlled type 1 diabetes is associated with altered glutathione homeostasis in adolescents: Apparent resistance to N -acetylcysteine supplementation. **Pediatric Diabetes**, v. 9, n. 6, p. 577–582, 2008.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais - Revisão. **Brazilian**

Journal of Pharmacognosy, v. 19, n. November 2008, p. 488–500, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/247854765_Efeitos_antidiabeticos_de_plantas_medicinais. Acesso em: 15 maio 2018.

EL-FAR, Y. M. et al. A newly developed silymarin nanoformulation as a potential antidiabetic agent in experimental diabetes. **Future Medicine Ltd**, v. 11, p. 2581–2602, 2016.

FALLEH, H. et al. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 331, n. 5, p. 372–379, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/5379676_Phenol_composition_of_Cynara_cardunculus_L_organs_and_their_biological_activities. Acesso em: 10 set. 2018

FAN, W. Epidemiology in diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Cardiovascular Endocrinology**, v. 6, n. 1, p. 8–16, 2017. Disponível em: <https://journals.lww.com/cardiovascularendocrinology/Pages/articleviewer.aspx?year=2017&issue=03000&article=00004&type=Fulltext>. Acesso em: 15 abr. 2018.

FARINHA, J. B. **Respostas glicêmicas, inflamatórias e de estresse oxidativo em diabéticos tipo 1 submetidos a diferentes protocolos de treinamento de alta intensidade**. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências do Movimento Humano) - Escola de Educação Física, Fisioterapia e Dança da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/181841>. Acesso em: 15 jun. 2019.

FEDERICO, A.; DALLIO, M.; LOGUERCIO, C. Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 16, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/312889116_SilymarinSilybin_and_Chronic_Liver_Disease_A_Marriage_of_Many_Years. Acesso em: 15 out. 2018.

FEDERIUK, I. F. et al. Induction of type-1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative Medicine**, v. 54, n. 3, p. 252–257, 2004. Disponível em: <https://europepmc.org/abstract/MED/15253270>. Acesso em: 10 fev. 2018.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42301997000100014. Acesso em: 10 fev. 2018.

FRENKEL, L. A. et al. N -Acetyl- l -Cysteine Supplement in Early Life or Adulthood Reduces Progression of Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. **Current Developments in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 1–11, 2018.

FRIGUET, B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 580, n. 12, p. 2910–2916, 2006. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2006.03.028>. Acesso em: 10 jan. 2018.

GAETANI, G. F. et al. Catalase and Glutathione Peroxidase Are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 334–339,

1989. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/20664091_Catalase_and_glutathione_peroxidase_are_equally_active_in_detoxication_of_hydrogen_peroxide_in_human_erythrocytes. Acesso em: 15 fev. 2018.

GAZAK, R.; WALTEROVA, D.; KREN, V. Silybin and Silymarin - New and Emerging Applications in Medicine. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 315–338, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305535>. Acesso em: 10 mar. 2018.

GHARAGOZLOO, M. et al. Immunosuppressive effect of silymarin on mitogen-activated protein kinase signalling pathway: The impact on T cell proliferation and cytokine production. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 113, n. 3, p. 209–214, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bcpt.12088>. Acesso em: 10 abr. 2018.

GHASEMI, H. et al. Protective effects of curcumin on diabetic nephropathy via attenuation of kidney injury molecule 1 (KIM-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression and alleviation of oxidative stress in rats with type 1 diabetes. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, p. 376–383, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/330520968_Protective_effects_of_curcumin_on_diabetic_nephropathy_via_attenuation_of_kidney_injury_molecule_1_KIM-1_and_neutrophil_gelatinase-associated_lipocalin_NGAL_expression_and_alleviation_of_oxidative_str. Acesso em: 15 out. 2019.

GODIC, A. et al. The Role of Antioxidant sin Skin Cancer Prevention and Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1–6, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/860479/>. Acesso em: 14 out. 2018.

HADI, A. et al. The effects of silymarin supplementation on metabolic status and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of clinical trials. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 41, n. June, p. 311–319, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0965229918305478>. Acesso em: 10 fev. 2019.

IDF. **Diabetes Atlas**, Eighth edition, 2017. Disponível em: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas>. Acesso em: 10 jul. 2019.

IGHODARO, O. M.; ADEOSUN, A. M.; AKINLOYE, O. A. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Medicina**, v. 53, p. 365–374, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010660X18300107>. Acesso em: 10 fev. 2018.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, p. 287–293, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506817301550>. Acesso em: 15 maio 2019.

KINNULA, V. L. et al. Biology of disease: generation and disposal of reactive oxygen

metabolites in the lung. **Lab. Invest.** v. 73, p. 3-19, 1995.

JAVEED, N.; MATVEYENKO, A. V. Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 33, n. 2, p. 138–150, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899235/>. Acesso em: 10 set. 2019.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1865–1879, 2006.

JORDÃO JR., A. A. et al. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ETANOL: PAPEL DA GLUTATIONA REDUZIDA E DA VITAMINA E. **Medicina**, v. 31, p. 434–449, 1998. Disponível em: http://revista.fmrp.usp.br/1998/vol31n3/peroxidacao_lipidica.pdf. Acesso em: 10 jan. 2018.

KARIMI, G. et al. Silymarin, a promising pharmacological agent for treatment of diseases. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 4, p. 308–317, jul. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3586829/>. Acesso em: 10 fev. 2018.

KAUT, N. N. DO N. et al. Baccharis trimera (Carqueja) Improves Metabolic and Redox Status in an Experimental Model of Type 1 Diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, n. Dm, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/6532637/>. Acesso em: 15 out. 2019.

KHEIRIPOUR, N. et al. Hepatoprotective effects of silymarin on liver injury via irisin upregulation and oxidative stress reduction in rats with type 2 diabetes. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 108–117, 2019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6423431/>. Acesso em: 15 out. 2019.

KIRSTEN, V. R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 3–10, 2010. Disponível em: <http://www.journals.usp.br/rmrp/article/view/159>. Acesso em: 15 mar. 2018.

KORDONOURI, O. et al. Other complications and diabetes-associated conditions in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 15, p. 270–278, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pedi.12183>. Acesso em: 15 mar. 2018.

KROLL, D. J.; SHAW, H. S.; OBERLIES, N. H. Milk Thistle Nomenclature: Why It Matters in Cancer Research and Pharmacokinetic Studies. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 2, p. 110–119, 2007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6287430_Milk_Thistle_Nomenclature_Why_It_Matters_in_Cancer_Research_and_Pharmacokinetic_Studies. Acesso em: 15 jun. 2018.

KUMAR, S.; MISHRA, A.; PANDEY, A. K. Antioxidant mediated protective effect of Parthenium hysterophorus against oxidative damage using in vitro models. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 120, p. 1–9, 2013. Disponível em: <https://bmccomplementalmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-120>. Acesso em: 15 abr. 2018.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 162750, p. 1–16, 2013. Disponível em:

- https://www.researchgate.net/publication/259957595_Chemistry_and_Biological_Activities_of_Flavonoids_An_Overview. Acesso em: 15 jan. 2018.
- LANI, R. et al. Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep11421>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- LELOUP, C. et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. **Diabetes**, v. 58, n. 3, p. 673–681, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2646066/>. Acesso em: 10 fev. 2018.
- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216–226, fev. 2008a. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-007-0886-7>. Acesso em: 08 jan. 2018.
- LENZEN, S. Oxidative stress: The vulnerable β -cell. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. 3, p. 343–347, jun. 2008b.
- LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 463–466, 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0891584996020515>. Acesso em: 8 jan. 2018.
- LEOPOLDINI, M. et al. Iron Chelation by the Powerful Antioxidant Flavonoid Quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6343–6351, 2006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf060986h>. Acesso em: 15 fev. 2018.
- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos: estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n. 2, p. 132–142, mar. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/acb/v18n2/15197.pdf>. Acesso em: 20 fev. 2018.
- LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 346–357, 1994. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330409?via%3Dihub>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193, p. 265–275, 1951.
- MAIESE, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Hindawi Limited, v. 2015, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443788/>. Acesso em: 10 dez. 2018.
- MALAISSÉ-LAGAE F., A. S.; MALAISSÉ, W. J. Contrasting modes of action of D-glucose and 3-O-methyl-D- glucose as protectors of the rat pancreatic B-cell against alloxan. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 762, n. 1983, p. 36–43, 1983. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167488983901143>. Acesso em: 15 mar. 2018.

- MALEKINEJAD, H. et al. Silymarin regulates the cytochrome P450 3A2 and glutathione peroxides in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 19, n. 7, p. 583–590, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711312000487>. Acesso em: 20 jan. 2018.
- MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signaling and Behavior**, v. 5, n. 4, p. 359–368, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2958585/>. Acesso em: 9 fev. 2018.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur. J. Biochem**, v. 47, p. 469–474, 1974. Disponível em: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>. Acesso em: 10 jul. 2018.
- MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 137–189, oct. 1995.
- MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, set. 2014. Disponível em: http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252014000300017. Acesso em: 22 abr. 2018.
- MATTEUCCI, E. et al. Liver disease in diabetes mellitus: Potential therapeutic value of vitamin e-silybin phytosomal complex. **Immunology, Endocrine and Metabolic Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 84–90, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/270480771_Liver_Disease_in_Diabetes_Mellitus_Potential_Therapeutic_Value_of_Vitamin_E-Silybin_Phytosomal_Complex. Acesso em: 10 jun. 2018.
- MAZZANTI, C. M. et al. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1061–1065, 2003. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782003000600010&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 10 maio 2018.
- MILIC, N. et al. New Therapeutic Potentials of Milk Thistle (*Silybum marianum*). **Natural product communications**, v. 8, n. 12, p. 1801–1810, 2013. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/259235912_New_Therapeutic_Potentials_of_Milk_Thistle_Silybum_marianum. Acesso em: 10 maio 2018.
- MIRANDA, P. H. DE A. et al. Vildagliptin induces beta-cell neogenesis and improves the lipid profile in a later phase of type 1 diabetes. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 1, p. 60–65, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/268282754_Vildagliptin_Induces_b-Cell_Neogenesis_And_Improves_The_Lipid_Profile_In_A_Later_Phase_Of_Type_1_Diabetes. Acesso em: 10 fev. 2018.
- MIRANDA, P. H. DE A. et al. Oral formulation of DPP-4 inhibitor plus Quercetin improves

metabolic homeostasis in type 1 diabetic rats. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 13, p. 1–13, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605959/>. Acesso em: 10 abr. 2018.

NATHAN, D. M. et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 14, p. 977–986, 1993. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199309303291401>. Acesso em: 14 mar. 2018.

NAUDI, A. et al. Cellular dysfunction in diabetes as maladaptive response to mitochondrial oxidative stress. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1–14, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/221755521_Cellular_Dysfunction_in_Diabetes_as_Maladaptive_Response_to_Mitochondrial_Oxidative_Stress. Acesso em: 15 jun. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PATCHE, J. et al. Diabetes-induced hepatic oxidative stress : a new pathogenic role for glycated albumin. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 102, p. 133–148, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/310812249_Diabetes-induced_hepatic_oxidative_stress_a_new_pathogenic_role_for_glycated_albumin. Acesso em: 20 nov. 2019.

PERKINS, B. A. et al. Exploring Patient Preferences for Adjunct-to-Insulin Therapy in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 250, p. 1–20, 2019.

PFERSCHY-WENZIG, E. M. et al. Identification of isosilybin a from milk thistle seeds as an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 4, p. 842–847, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np400943b>. Acesso em: 15 fev. 2019.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/np9904509>. Acesso em: 10 jan. 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039>. Acesso em: 15 ago. 2018.

POLYAK, S. J. et al. Silymarin for hepatitis C virus infection. **Antivir Ther**, v. 18, n. 2, p. 141–147, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4076489/>. Acesso em: 10 maio 2018.

QIN, N. et al. Hypoglycemic effect of silychristin A from *Silybum marianum* fruit via protecting pancreatic islet β cells from oxidative damage and inhibiting α -glucosidase activity in vitro and in rats with type 1 diabetes. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 168–179, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464617305261>.

Acesso em: 10 dez. 2018.

QUEIROZ, P. C. DE et al. Prevalence of micro and macrovascular complications and the risk factors in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 254–258, 2011. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1679-1010/2011/v9n4/a2181>. Acesso em: 14 maio 2018.

RADENKOVIĆ, M.; STOJANOVIĆ, M.; PROSTRAN, M. Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 78, p. 13–31, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/283855094_Experimental_diabetes_induced_by_all_oxan_and_streptozotocin_The_current_state_of_the_art. Acesso em: 10 set. 2018.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189–207, 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365906002057>. Acesso em: 15 set. 2019.

ROJAS, J. et al. Pancreatic Beta Cell Death : Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p. 1–19, 2018. Disponível em: <https://www.thefreelibrary.com/Pancreatic+Beta+Cell+Death%3a+Novel+Potential+Mechanisms+in+Diabetes...-a0587655508>. Acesso em: 21 dez. 2018.

ROSSONI JÚNIOR, J. V. et al. Annatto extract and β -carotene modulate the production of reactive oxygen species/nitric oxide in neutrophils from diabetic rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 177–183, 2012a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3334368/>. Acesso em: 14 out. 2018.

ROSSONI JÚNIOR, J. V. et al. Annatto extract and β -carotene enhances antioxidant status and regulate gene expression in neutrophils of diabetic rats. **Free Radical Research**, v. 46, n. 3, p. 329–338, 2012b. Disponível em: <http://www.medicinabiomolecular.com.br/biblioteca/pdfs/Doencas/do-1652.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2018.

SANTOS, A. et al. The diosmin antioxidant effect: an integrative review. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 43, n. 2, p. 97–103, 2018.

SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. São Paulo: Clannad, 2017. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em: 10 maio 2019.

SEKINE, N. et al. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic β -cells. Potential role in nutrient sensing. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4895–4902, 1994. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/269/7/4895.short>. Acesso em: 10 jan. 2018.

SILVA, A. R. et al. Green banana pasta diet prevents oxidative damage in liver and kidney and improves biochemical parameters in type 1 diabetic rats. **Arch Endocrinol Metab**, v. 60, n. 4, p. 355–366, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/aem/2016nahead/2359-3997-aem->

2359-3997000000152.pdf. Acesso em: 15 abr. 2018.

SILVA, J. M., FERRARI, W.; K. B. C. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, p. 441–451, 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1809-98232011000300005&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 10 abr. 2018.

SILVA, V. D.; NOGUEIRA, M. R. B. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 9–15, 2015.

SILVA, M. **Participação e homeostase do ferro no diabetes tipo 1 em modelos animais participação e homeostase do ferro no diabetes**. 128 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Biologia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/2919/3/TESE_Participa%c3%a7%c3%a3oHomeostaseFerro.PDF. Acesso em: 15 jan. 2019.

SILVA, M. et al. Effects of the interaction of diabetes and iron supplementation on hepatic and pancreatic tissues, oxidative stress markers, and liver peroxisome proliferator-activated receptor- α expression. **J. Clin. Biochem. Nutr**, v. 49, n. 2, p. 102–108, 2011a.

SILVA, M. et al. Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 55, n. 1, p. 46–53, fev. 2011b. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302011000100006. Acesso em: 10 maio 2018.

SIVUKHINA, E. V.; JIRIKOWSKI, G. F. Magnocellular hypothalamic system and its interaction with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Steroids**, v. 111, p. 21–28, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039128X1600009X>. Acesso em: 10 abr. 2018.

SOTO, C. et al. Silymarin induces recovery of pancreatic function after alloxan damage in rats. **Life Sciences**, v. 75, p. 2167–2180, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0024320504005442>. Acesso em: 10 mar. 2018.

STADLER, K. et al. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1240–1251, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891584903004994>. Acesso em: 21 maio 2018.

STOLF, A. M. et al. Effects of silymarin on angiogenesis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. June, p. 232–243, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332218339301>. Acesso em: 23 mar. 2019.

STOLF, A. M.; CARDOSO, C. C.; ACCO, A. Effects of Silymarin on Diabetes Mellitus

Complications : A Review. **Phytotherapy Research**, n. December 2016, p. 9, 2017. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/312932396_Effects_of_Silymarin_on_Diabetes_Mellitus_Complications_A_Review_SILYMARIN_ON_DIABETES_COMPLICATIONS.

Acesso em: 10 abr. 2018.

SURAI, P. F. Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 204–247, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665566/>. Acesso em: 25 out. 2018.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536- 546., 2001. Disponível em: <http://www.biomed.cas.cz/physiolres/2001/issue6/pdf/szkudelski.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2018.

TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. **Hypertension**, v. 42, n. 6, p. 1075–1081, 2003. Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>. Acesso em: 10 abr. 2018.

TAYOUB, G.; ALORFI, H. S. AND M. Quantitative identification of total silymarin in wild *Silybum marianum* L. by using HPLC. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 6, n. 2, p. 110–114, 2018. Disponível em: <http://www.florajournal.com/archives/2018/vol6issue2/PartB/7-1-21-585.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2019.

TEPONNO, R. B.; KUSARI, S.; SPITELLER, M. Recent advances in research on lignans and neolignans. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 1044-1092, 2016. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/np/c6np00021e#!divAbstract>. Acesso em: 15 mar. 2019.

TRIPATHI, V.; VERMA, J. Different models used to induce diabetes: a comprehensive review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 6, p. 29–32, 2014.

TUORKEY, M. J.; EL-DESOUKI, N. I.; KAMEL, R. A. Cytoprotective Effect of Silymarin against Diabetes-Induced Cardiomyocyte Apoptosis in Diabetic Rats. **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 28, n. 1, p. 36–43, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/296806552_Cytoprotective_Effect_of_Silymarin_a_gainst_Diabetes-Induced_Cardiomyocyte_Apoptosis_in_Diabetic_Rats](https://www.researchgate.net/publication/296806552_Cytoprotective_Effect_of_Silymarin_against_Diabetes-Induced_Cardiomyocyte_Apoptosis_in_Diabetic_Rats). Acesso em: 10 abr. 2018.

VARGAS-MENDOZA, N. et al. Hepatoprotective effect of silymarin. **World J Hepatol**, v. 6, n. 3, p. 144–149, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24672644/>. Acesso em: 7 abr. 2018.

VERNILLO, A. T. Diabetes mellitus: Relevance to dental treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 91, n. 3, p. 263–270, 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210401714072>. Acesso em: 16 abr. 2018.

VESSAL, G. et al. Silymarin and milk thistle extract may prevent the progression of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. **Renal Failure**, v. 32, n. 6, p. 733–739, 2010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/0886022X.2010.486488>. Acesso em: 16 fev. 2018.

VOLPE, C. M. O. et al. Morte celular , espécies reativas de oxigênio (ROS) e complicações diabéticas. **Cell Death & Disease**, v. 9, p. 1–29, 2018.

WANG, J.; WANG, H. Oxidative stress in pancreatic beta cell regeneration. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–9, 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/318892370_Oxidative_Stress_in_Pancreatic_Beta_Cell_Regeneration. Acesso em: 14 fev. 2019.

WANG, Te et al. The protective effects of silibinin in the treatment of streptocozotocin-induced diabetic osteoporossi in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 89, p. 681–688, 2017.

WRIGHT, L. A.; HIRSCH, I. B. Non-insulin treatments for Type 1 diabetes: critical appraisal of the available evidence and insight into future directions. **Diabetic Medicine**, v. 36, n. 6, p. 665–678, 27 jun. 2019.

ZAKARYAN, H. et al. Concentration and flow distributions in urban street canyons: Wind tunnel and computational data. **Archives of virology**, v. 162, n. 9, p. 2539–2551, 2017.

ANEXO I: COMPROVANTE SUBMISSÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Análise da eficácia da Silymarina sobre a modulação de parâmetros metabólicos e marcadores do estado redox celular em um modelo experimental de Diabetes Tipo 1 induzido por Aloxano", protocolada sob o CEUA nº 6474200418 (ID 000050), sob a responsabilidade de **Daniela Caldeira Costa Calsavara e equipe; Laise Mara Oliveira Miranda; Livia da Cunha Agostini** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 15/06/2018.

We certify that the proposal "Analysis of the efficacy of the Silymarin on the modulation of metabolic parameters and markers of the cellular Redox state in an experimental model of Aloxane-Induced Type 1 Diabetes", utilizing 66 Isogenic rats (66 females), protocol number CEUA 6474200418 (ID 000050), under the responsibility of **Daniela Caldeira Costa Calsavara and team; Laise Mara Oliveira Miranda; Livia da Cunha Agostini** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 06/15/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 08/2018 a 08/2020 Área: Ciências Biológicas

Origem:	Biotério de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição		
Espécie:	Ratos isogênicos	sexo:	Fêmeas
		idade:	8 a 9 semanas
		N:	66
Linhagem:	Fischer	Peso:	180 a 200 g

Local do experimento: Laboratório de Nutrição Experimental da situado na Escola de Nutrição

Ouro Preto, 15 de junho de 2018

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO II: COMPROVANTE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Biomedical and Environmental Sciences

[Home](#)

[Author](#)

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to
Biomedical and Environmental Sciences

Manuscript ID
BES10332

Title
Silymarin attenuates hepatic and pancreatic redox imbalance independently of glycemic regulation in alloxan-induced diabetic rats

Authors
Miranda, Laise Mara
Agostini, Livia
Lima, Wanderson
Camini, Fernanda
Costa, Daniela

Date Submitted
07-Dec-2019

[Author Dashboard](#)

