



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA METABÓLICA



Lívia da Cunha Agostini

**EFEITO DA SILIMARINA NA MODULAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO REDOX EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

OURO PRETO

2019

Lívia da Cunha Agostini

**EFEITO DA SILIMARINA NA MODULAÇÃO DO DESEQUILÍBRIO REDOX EM
MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 1**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Ouro Preto como
requisito obrigatório para a obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Daniela Caldeira Costa
Coorientadora: Laíse Mara Oliveira Miranda

OURO PRETO

2019

A276e Agostini, Livia da Cunha.
Efeito da Silimarina na modulação do desequilíbrio redox em modelo experimental de Diabetes tipo 1 [manuscrito] / Livia da Cunha Agostini. - 2019.

38f.:

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Caldeira Costa.

Coorientadora: Prof^ª. MSc^ª. Laise Mara Oliveira Miranda.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Diabetes . 2. Flavonóides. 3. Antioxidantes. 4. Ratos. I. Costa, Daniela Caldeira. II. Miranda, Laise Mara Oliveira. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.379.008.64

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

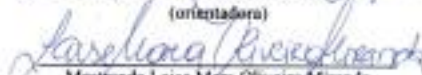
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

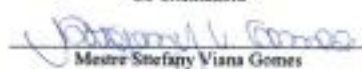
Escola de Farmácia




ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 437ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 28 do mês de junho de dois mil e dezenove, sexta-feira, realizou-se, a partir das 9 horas, na sala 1 da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Livia da Cunha Agostini**, matrícula 14.1.2120, intitulada **Efeito da Silimarina na modulação do desequilíbrio redox em modelo experimental de Diabetes tipo I**. A Banca Examinadora foi constituída pela Doutora Fernanda Caetano Camini, CBIOL/ICEB/UFOP, pela Mestre Stefany Viana Gomes, UFOP, pela co-orientadora Mestranda Laise Mara Oliveira Miranda, Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição/ENUT/UFOP e pela orientadora Profa. Dra. Daniela Caldera Costa, DECBI/ICEB/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua suspensão, com a NOTA 9,5. Comunicou-se a candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 28 de junho de 2019.


Profa. Dra. Daniela Caldera Costa
(orientadora)


Mestranda Laise Mara Oliveira Miranda
Co-orientadora


Mestre Stefany Viana Gomes


Doutora Fernanda Caetano Camini


Profa. Dra. Glenda Nicoli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me iluminar e guiar.

Agradeço aos meus Pais, Cláudio e Mercês por sempre sonhar comigo e tornar tudo possível.

Agradeço ao meu irmão João Vitor pela torcida e companheirismo.

Agradeço a minha avó Dalzira (in memorian) por ser meu anjo da guarda.

Agradeço a minha avó Tereza por sempre me apoiar e incentivar.

Agradeço a minha família por sempre estar comigo.

Agradeço ao meu namorado Gabriel pelo carinho e por mostrar o melhor que posso ser.

Agradeço aos meus amigos Breno, Amira, Karine, Nat, Risadinha, Titi por tornarem meus dias melhores.

Agradeço à minha república do coração, Drosófila, por ser uma família e por fazer desses cinco anos os melhores que já vivi

Agradeço ao LBM por todo o aprendizado e suporte.

Agradeço à minha orientadora Daniela por sempre estar nos incentivando, dando todo o suporte possível, pelos conhecimentos e pela atenção.

Agradeço à minha co-orientadora Laise por sempre me mostrar que posso ir além, por confiar em mim e pela parceria.

Agradeço à Escola de Farmácia por ter me proporcionado um ensino de qualidade.

E por fim agradeço a Ouro Preto, essa cidade maravilhosa, que me proporcionou os melhores anos da minha vida. Sou eternamente grata e realizada!

RESUMO

A *Silybum marianum* apresenta como componente majoritário a silimarina, um potente antioxidante, que pode desempenhar um papel protetor em doenças cuja patogênese envolva o desequilíbrio *redox*. Sabe-se que os elementos-chaves no agravamento e desenvolvimento das complicações do diabetes são as alterações metabólicas e o estresse oxidativo. Sendo assim, este estudo teve como objetivo investigar o potencial terapêutico da silimarina na homeostase metabólica e no *status redox* em modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 1. Para tal, utilizamos 34 ratas da linhagem *Fisher* distribuídas em 4 grupos: C (n= 8), D (n=8), DS50 (n=10) e DS100 (n=8). O tratamento teve a duração de 30 dias e foi administrado por gavagem oro-gástrica. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados para a retirada de soro e tecido pancreático. Para avaliar o potencial terapêutico da silimarina e para confirmar o Diabetes *Mellitus* tipo 1 analisamos a variação da massa corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar, glicemia, concentrações séricas de triglicérides e ureia, atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido pancreático, os níveis de proteína carbonilada, o número e área de ilhotas pancreáticas. O Diabetes tipo 1 foi confirmado pela presença de hiperglicemia, perda significativa de massa corpórea, polidipsia e polifagia, sendo todos esses sintomas característicos da doença. O tratamento com a silimarina nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg não foram eficazes na preservação da massa corpórea. A silimarina nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg foram eficazes na diminuição da ingestão hídrica e na ingestão alimentar. Ambas as doses de silimarina não foram eficazes em reduzir a glicemia. Observamos também uma diminuição nos níveis de proteína carbonilada no pâncreas de animais diabéticos tratados tanto com as doses de 50 quanto de 100 mg/kg, sugerindo que o tratamento foi efetivo para proteger do dano proteico. Já os parâmetros de ureia e triglicérides sérico, SOD e CAT pancreática e número/área das ilhotas não sofreram interferência da silimarina. Esses resultados podem ser devido ao tempo de tratamento e a concentração de silimarina utilizada, tendo em vista que em outros estudos foram encontrados resultados satisfatórios quando o tempo de tratamento e as doses de silimarina utilizadas eram maiores. Com isso, são necessários mais estudos com a silimarina no que diz respeito à sua capacidade antioxidante e protetora no Diabetes tipo 1.

PALAVRAS-CHAVE: diabetes *mellitus* tipo 1, desequilíbrio *redox*, antioxidante, silimarina, ratos *wistar*.

ABSTRACT

Silybum marianum has as its major component silymarin, a potent antioxidant, which may play a protective role in diseases whose pathogenesis involves *redox* imbalance. It is known that the key elements in the aggravation and development of diabetes complications are biochemical parameters and oxidative stress. The objective of this study was to investigate the therapeutic potential of silymarin in metabolic homeostasis and redox status in an experimental model of type 1 diabetes mellitus. For this purpose, 34 rats of the Fisher strain were distributed in four groups: C (n = 8), D (n = 8), DS50 (n = 10) and DS100 (n = 8). The treatment lasted for 30 days and was administered by oro-gastric gavage. At the end of the experiment, the animals were euthanized for the removal of serum and pancreatic tissue. To assess the therapeutic potential of silymarin and to confirm type 1 diabetes mellitus we analyzed body mass variation, water intake, dietary intake, glycemia, serum triglyceride and urea concentrations, enzyme activity superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in pancreatic tissue, levels of carbonylated protein, number and area of pancreatic islets. Type 1 diabetes was confirmed by the presence of hyperglycemia, significant loss of body mass, polydipsia and polyphagia, all of which are characteristic symptoms of the disease. Treatment with silymarin at doses of 50 mg / kg and 100 mg / kg were not effective in preserving body mass. Silymarin at doses of 50 mg / kg and 100 mg / kg were effective in reducing water intake and food intake. Both doses of silymarin were not effective in reducing glycemia. We also observed a decrease in levels of carbonylated protein in the pancreas of diabetic animals treated at both the 50 and 100 mg / kg doses, suggesting that the treatment was effective in protecting protein damage. On the other hand the parameters of serum urea and triglycerides, SOD and pancreatic CAT and islet number / area were not affected by silymarin. These results may be due to the time of treatment and the concentration of silymarin used, since other studies have found satisfactory results when the time of treatment and the doses of silymarin used were higher. Therefore, further studies are needed with silymarin for its antioxidant and protective capacity in type 1 diabetes.

KEY WORDS: diabetes mellitus type 1, redox imbalance, antioxidant, silymarin, wistar rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Delineamento experimental.....	19
FIGURA 2 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre a massa corpórea dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	23
FIGURA 3 - Avaliação da ingestão alimentar e hídrica dos animais controle e diabéticos tratados ou não com a silimarina.....	25
FIGURA 4 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre os níveis séricos de glicose dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	26
FIGURA 5 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre os níveis séricos de ureia dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	27
FIGURA 6 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre os níveis séricos de glicose dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	29
FIGURA 7 - Avaliação do tratamento com silimarina sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	30
FIGURA 8 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre a oxidação de proteínas dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	31
FIGURA 9 – Avaliação do tratamento com silimarina sobre glicose número e a área das ilhotas pancreáticas dos animais controle e diabéticos tratados ou não com silimarina.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

C – Grupo Controle

CAT – Catalase

CBP – Células Beta Pancreáticas

CMC - Carboximetilcelulose

D – Grupo Diabético

DM – Diabetes Mellitus

DM1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazina

DS50 – Grupo Diabético Silimarina dose 50 mg/Kg

DS100 – Grupo Diabético Silimarina dose 100 mg/Kg

ERO – Espécie Reativa de Oxigênio

GPx – Glutathione Peroxidase

NF- κ B – Fator de Transcrição Fator Nuclear Kappa BNO – Óxido Nitrico

SOD – Superóxido Dismutase

SUS – Sistema único de Saúde

SBS- Sociedade Brasileira de Diabetes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2.1 - Objetivo geral:	12
2.2 - Objetivos específicos:	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 – Definição e Classificação do Diabetes Mellitus	13
3.2 – Modelo experimental de diabetes tipo 1	14
3.3 – Estresse oxidativo e Diabetes	15
3.4 – <i>Silybum marianum</i> (silimarina)	16
4 METODOLOGIA	18
4.1 – Delineamento Experimental	18
4.2– Indução do Diabetes Experimental	19
4.3- Massa corpórea.....	19
4.4 - Ingestão hídrica e alimentar.....	19
4.5 – Análises dos parâmetros Bioquímicos do Soro e Plasma	20
4.6- Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	20
4.7– Atividade da Catalase (CAT)	20
4.8 – Proteína Carbonilada	21
4.9– Análise Estatística.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	34
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *Mellitus tipo 1* (DM1) é uma doença crônica causada principalmente pelo sistema imunológico que destrói as células beta pancreáticas impossibilitando-as de produzir o hormônio insulina, responsável pela manutenção dos níveis fisiológicos de glicose na corrente sanguínea (YOON; JUN, 2005).

Os principais sintomas do DM1 são perda de peso, polifagia, polidipsia, poliúria, fadiga e cetoacidose, podendo evoluir para casos mais graves que desenvolvem nefropatia, neuropatia, além da retinopatia e amputação dos membros (ALBERTI; ZIMMET, 1998).

A hiperglicemia é frequente nesses indivíduos e sabe-se que essa condição resulta em alteração dos parâmetros metabólicos e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), além da acentuação de mecanismos responsáveis pela glicosilação de enzimas antioxidantes. Por essa razão, tanto alterações metabólicas quanto as ERO's e a ineficiência do sistema enzimático de defesa antioxidante levam a um desequilíbrio *redox* onde se tem uma alta concentração de enzimas oxidantes e uma baixa concentração de enzimas antioxidantes que estão intimamente ligados ao aparecimento e evolução das complicações relacionadas ao DM1 (ZHAO, 2001).

A farmacoterapia utilizada no DM1 é a insulino terapia, mas acredita-se que este seja um tratamento incômodo visto que é necessário a administração sistemática e periódica de injeções de insulina para manter os níveis glicêmicos dentro da regularidade (CAÑIBANO – HERMÁNDEZ et al., 2018). Assim torna-se essencial o estabelecimento de terapias coadjuvantes que possam melhorar o controle glicêmico e minimizar as complicações micro e macrovasculares decorrentes do DM1. Neste sentido a busca por princípios ativos provenientes de plantas que tenham efeitos antioxidantes pode ser um fator importante para diminuir o desequilíbrio *redox*.

A *Silybum marianum* ou “cardo de leite” pertencente à família *Asteraceae*, apresenta como componente majoritário a silimarina, um potente antioxidante que apresenta potencial para diminuir o desequilíbrio *redox* e consequentemente os efeitos deletérios causados pelo excesso das ERO's (JÚNIOR; LEMOS, 2012).

Baseado no exposto, hipotetizamos que a silimarina possa melhorar o perfil metabólico e o estado *redox* em ratas com DM1.

2 OBJETIVO

2.1 - Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da *Silimum marianum* (silimarina) sobre os parâmetros metabólicos e o *status redox* em ratas diabéticas tipo 1 (DM1) induzidas por Aloxano.

2.2 - Objetivos específicos:

I) Avaliar no soro de animais controle e diabéticos tratados ou não com *Silimum marianum* (silimarina):

- 1) Glicemia;
- 2) Triglicerídeos;
- 3) Ureia.

II) Avaliar no pâncreas e animais controle e diabéticos tratados ou não com *Silimum marianum* (silimarina):

- 1) A atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT);
- 2) Biomarcador de dano oxidativo: Proteína carbonilada.

III) Quantificar o número e área das ilhotas pancreáticas: morfometria.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Definição e Classificação do Diabetes Mellitus

O DM sendo uma condição crônica possui acentuadas complicações decorrentes do crescimento e envelhecimento populacional, urbanização, hábitos de vida com elevada prevalência de obesidade e sedentarismo, além da maior sobrevivência dos pacientes portadores da doença. Outro fator importante é que no Brasil no ano de 2018, 16 milhões de indivíduos apresentavam DM entre 20 e 79 anos. A estimativa é que se tenha em 2040, 23,3 milhões de pessoas portadoras de DM no Brasil nesta mesma faixa etária (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

Ainda de acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2018) (SBD), dados indicam que a taxa de incidência de DM1 cresceu 61,8% na última década. No presente momento essa ocorrência em crianças vem aumentando principalmente na população infantil com menos de 5 anos de idade.

O Diabetes Mellitus é caracterizado por uma hiperglicemia crônica, desencadeada pela inibição da secreção de insulina e/ou problemas em sua ação. Esse distúrbio no metabolismo gera uma hiperglicemia crônica responsável por desencadear diversas complicações a longo prazo, as quais incluem a dislipidemia e cetoacidose, complicações microvasculares, tais como retinopatia, neuropatia e nefropatia. Além disso, há complicações macrovasculares, como as doenças coronarianas (CORTEZ *et al.*, 2014).

Sendo assim, sabe-se que os efeitos fisiopatológicos gerados pelo DM estão intimamente ligados às células beta pancreáticas (CBP) responsáveis pela produção de insulina, que mantém o metabolismo regulado e os níveis glicêmicos dentro da normalidade (CORTEZ *et al.*, 2014).

Neste sentido, o Diabetes Mellitus pode ser classificado de acordo com suas causas, aspectos metabólicos relacionados às células beta pancreáticas (CBP) e fisiopatológicos. Os tipos principais são o diabetes tipo 1 e tipo 2, além do diabetes gestacional (ROJAS *et al.*, 2017).

O DM1 é uma doença que tem caráter autoimune genético onde os linfócitos T e auto anticorpos destroem seletivamente as CBP, levando a um déficit absoluto de insulina (ROJAS *et al.*, 2017).

Pessoas portadoras de DM1 são insulino dependentes precisando de doses reguladas de insulina para manter os níveis de glicose no sangue e evitar a cetoacidose diabética.

Geralmente acomete crianças e adolescentes e leva a várias alterações metabólicas como poliúria, polidipsia, polifagia e emagrecimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2018).

Já o DM2, constitui 90-95% dos casos de DM, e é caracterizado por uma resistência à insulina com a diminuição da sua ação principalmente nos tecidos hepático, adiposo e muscular levando a uma hiperglicemia crônica (ROJAS *et al.*, 2017).

Visto que as alterações bioquímicas decorrentes da ausência de insulina são bem caracterizadas no DM1, utilizamos o modelo experimental de DM1 induzido farmacologicamente para avaliarmos o potencial terapêutico da silimarina na modulação dos parâmetros metabólicos e do *status redox*.

3.2 – Modelo experimental de diabetes tipo 1

Na busca por esclarecimento acerca do mecanismo da patogenicidade e possibilidades terapêuticas complementares do DM1 em humanos, alguns modelos experimentais são utilizados para reproduzir de modo mais autêntico possível e desta forma possibilitar o estudo desde a fase pré-clínica até as manifestações da doença associada ao estágio crônico (REWER; KLINGENSMITH, 1997).

O aloxano é amplamente utilizado em pesquisas no que se refere aos estudos de DM1 (PEREIRA *et al.*, 2016). Diferentemente do que ocorre no mecanismo autoimune do diabetes onde as CBP morrem por apoptose, esse composto desencadeia um processo de necrose seletiva das mesmas sendo altamente diabetogênico levando ao aparecimento dos sintomas clássicos do DM1 como polidipsia, polifagia, perda de peso e hiperglicemia acentuada (PEREIRA *et al.*, 2016).

O aloxano (2,4,5,6-Tetraoxypyrimidine) é um composto hidrofílico com estrutura química similar a da glicose não transpondo a bicamada lipídica de modo efetivo (LENZEN; MUNDAY, 1991). As células beta pancreáticas possuem o GLUT-2 que é um transportador que possibilita a passagem de glicose para o meio intracelular. Do mesmo modo, o GLUT-2 permite que a molécula de aloxano se ligue a ele promovendo a sua passagem pela bicamada lipídica até o citosol, favorecendo a sua ação tóxica nas CBP (WEAVER *et al.*, 1978).

A insulinopenia estimulada pelo aloxano deve-se em partes pela redução da secreção de insulina por atuar seletivamente nas células pancreáticas por meio da inibição da glicoquinase, que atua sinalizando quando há presença de glicose na corrente sanguínea

(WEAVER *et al.*, 1978). Além disto, o aloxano predispõe a formação de espécies reativas de oxigênio levando à destruição das CBP (LENZEN, 2008).

Outro mecanismo pelo qual o aloxano é altamente diabetogênico é através da produção de ERO. Isto se dá através da redução do aloxano em ácido dialúrico que sofre uma auto-oxidação gerando radicais tóxicos como o superóxido, peróxido de hidrogênio e, na presença de catalisador metálico como o ferro, radicais hidroxila (MUNDAY, 1988).

O aloxano exerce sua ação inibindo a fosforilação da glicose através da inibição da glicoquinase, o que leva a uma redução na oxidação da glicose e conseqüentemente a uma diminuição na produção de ATP. Sabe-se que o ATP é necessário para induzir o fechamento dos canais de K^+ sensíveis a ATP e despolarizar as membranas das CBP, levando à abertura dos canais de Ca^{++} sensíveis a voltagem. O aumento no influxo de Ca^{++} leva a excitose dos grânulos contendo insulina. Sendo assim, o aloxano impede a secreção de insulina, levando a um quadro de hiperglicemia (LENZEN, 2008; PANTEN, 1988).

Sendo assim, a ação tóxica do aloxano está relacionada a dois efeitos patológicos distintos que incluem: (1) inibição na liberação de insulina, através da inibição da glicoquinase, e (2) formação de espécies reativas de oxigênio, que promove a necrose seletiva das CBP. Ambos os efeitos resultam coletivamente em um estado fisiopatológico de diabetes insulino-dependente ou diabetes mellitus similar ao tipo 1 (IGODARO *et al.*, 2017).

Baseado no exposto pode-se inferir que a administração do aloxano inibe a produção e secreção de insulina pelas CBP mediada pelo estresse oxidativo bem como inibição da glicoquinase. Isto torna a utilização do aloxano como fármaco diabetogênico interessante para estudos de DM1, já que o estresse oxidativo é um dos fatores determinantes na progressão e agravamento desta doença.

3.3 – Estresse oxidativo e Diabetes

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre agentes oxidantes e agentes antioxidantes intracelulares podendo estar relacionado à ineficiência do sistema fisiológico protetor em combater essas espécies reativas, causando danos às células e tecidos, o que pode interferir em suas ações biológicas (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

Em pacientes diabéticos, sabe-se que a hiperglicemia favorece o aumento de ERO e diminui os níveis de óxido nítrico (NO), ativando a enzima aldose-redutase e aumentando a taxa de conversão de glicose a sorbitol, através da via dos polióis. Com isso, há uma redução de

NADPH e glutationa (importante agente antioxidante intracelular) e conseqüentemente aumento do estresse oxidativo (REIS *et al.*, 2008).

Fisiologicamente estão presentes alguns antioxidantes que participam da defesa do organismo contra o ataque de ERO. Dentre os antioxidantes enzimáticos, destacam-se a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutationa peroxidase (GPx) (STINEFELT *et al.*, 2005).

A SOD é a primeira linha de defesa do organismo contra as ERO's transformando o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Posteriormente a CAT atua convertendo esse peróxido de hidrogênio em oxigênio livre e água. (TIWARI *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2013). Além disso, existem sistemas antioxidantes não enzimáticos de origem dietética como minerais (selênio, zinco, magnésio e cobre), compostos fenólicos e vitaminas, como o ácido ascórbico (vitamina C), β-caroteno (vitamina A) e α-tocoferol (vitamina E) (BARBOSA *et al.*, 2010).

Visto que em indivíduos portadores de DM há desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e agentes oxidantes, entende-se que substâncias de caráter antioxidante poderia ser uma terapia coadjuvante em patologias onde se observa um desequilíbrio redox significativo como no diabetes

3.4 – *Silybum marianum* (silimarina)

A silimarina é da família Asteraceae, um extrato seco das sementes de *Silybum marianum*, formada por outras flavoligninas como silibina, isosilibina, silicristina e silidianina e o flavonoide taxifolina (STOLF *et al.*, 2017).

Já foi descrito efeitos promissores da silimarina na disfunção hepática, diabetes, osteoporose, artrite, câncer, hipercolesterolemia e sepse (STOLF *et al.*, 2017).

Ross e outros (2008) sugeriram que essa planta por ser caracterizada como da classe dos flavonoides, possui uma ação antioxidante, podendo ser bem mais potente que a vitamina E. Além disso, possui a capacidade de aumentar a concentração de glutationa e atividade da superóxido dismutase, ambos apresentando propriedades antioxidantes.

Sendo assim, um dos principais benefícios da silimarina é a sua ação antioxidante, responsável por manter o equilíbrio redox da célula (SOTO *et al.*, 2010). Sabe-se ainda que a silimarina é capaz de inibir vias dependentes do fator nuclear κB (NF-κB), levando a uma diminuição da resposta inflamatória. Outro fator importante é que ao inibir enzimas que produzem ERO, como a enzima NADPH oxidase, a silimarina teria o potencial de restaurar o

equilíbrio redox e minimizar as complicações decorrentes do estresse oxidativo (SALAMONE *et al.*, 2012).

Baseado no exposto, o presente projeto visa estudar os efeitos da silimarina na modulação de parâmetros metabólicos e do status redox em modelo experimental de DM1.

4 METODOLOGIA

4.1 – Delineamento Experimental

Foram utilizadas 34 ratas albinas da linhagem *Fisher*, com aproximadamente 08 semanas de idade e com massa corpórea média de 200 g, alocados no biotério da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em gaiolas metabólicas.

Submetemos os animais a um jejum de 8 horas e após esse tempo o Diabetes foi induzido experimentalmente com aloxano por via intraperitoneal na dose de 135mg/Kg e o grupo C teve uma administração de 0,2 mL de NaCl a 0,9% por via intraperitoneal. Em seguida esperou-se três dias para a confirmação do diabetes através da aferição da glicemia de jejum na cauda dos animais utilizando-se tiras reativas ACCU-CHECK®. Foram considerados animais diabéticos aqueles com glicemia ≥ 300 mg/dL. Após a confirmação do diabetes, as ratas foram submetidas aos tratamentos por gavagem oro-gástrica por 30 dias consecutivos. Os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais: grupo controle (C): receberam 1mL do veículo carboximetilcelulose (CMC 0,5%); grupo diabético (D): receberam 1mL do veículo carboximetilcelulose (CMC 0,5%); Grupo diabético tratado com silimarina dose 1 (DS50): receberam 1mL de silimarina na dose 50mg/Kg; Grupo diabético tratado silimarina dose 2 (DS100): receberam 1mL de silimarina na dose de 100mg/Kg, conforme ilustrado na figura 1. No 31º dia os animais foram deixados em jejum por 8 horas, em seguida foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por exsanguinação. Amostras de sangue e pâncreas foram coletadas e armazenadas em freezer - 80°C para análises bioquímicas e do status redox, respectivamente.

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), sob o número de protocolo 6474200418.

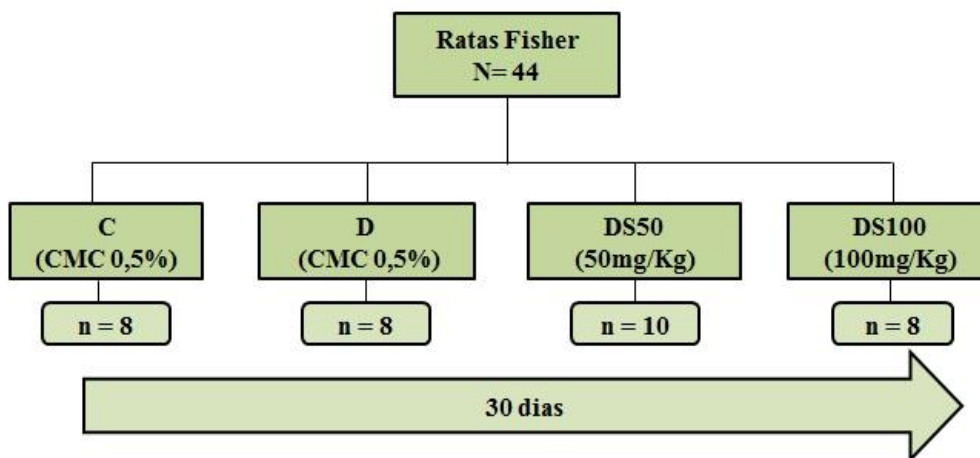


Figura 1: Delineamento experimental. C: grupo controle, D: grupo diabético, DS50: grupo diabético tratado com silimarina na dose de 50mg/Kg, DS100: grupo diabético tratado com silimarina na dose de 100mg/Kg

4.2– Indução do Diabetes Experimental

Para indução do diabetes as ratas pertencentes aos 4 grupos diabéticos receberam, após 8 horas de jejum, dose única de injeção intraperitoneal a 135mg/Kg de massa corpórea de Alozano (ALX) (Alloxan Monohydrate Sigma[®]), também conhecido como 2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina monoidratada dissolvida em 0,2mL de NaCl a 0,9%. O grupo controle recebeu injeção intraperitoneal contendo o mesmo volume de solução de NaCl a 0,9%. Posteriormente à indução, foi administrado aos animais uma solução de glicose 10%. Para confirmação do diabetes, três dias após a injeção de alozano, os animais foram submetidos a uma avaliação dos níveis de glicose plasmática em jejum de 8 horas, empregando-se amostra de sangue coletada da cauda. Os níveis de glicose foram medidos por meio de um glicosímetro Accu-Chek Advantage[®](Boehringer Mannheim, IN, USA). Os animais com glicemia de jejum superior a 300 mg/dl (~16.6 mmol/L) foram considerados diabéticos.

4.3 – Massa corpórea inicial, final e sua variação

Os valores da massa corpórea de cada animal foram obtidos através da pesagem em balança analítica no início do tratamento com a silimarina até o 30º dia, uma vez a cada semana. Para a variação de peso corporal, subtraiu-se a massa inicial da massa final.

4.4 – Ingestão hídrica e alimentar

Os valores da ingestão hídrica foram obtidos através da diferença de volume inicial (600mL) e o volume final de água que restou. Para isso contamos com a ajuda de uma proveta de vidro graduada. Analisamos a ingestão hídrica durante os 30 dias de tratamento dos animais. Os valores da ingestão alimentar foram obtidos através da diferença de peso inicial (250g) e o peso final de ração industrial que restou. As rações foram pesadas com a ajuda de uma balança analítica em dias alternados durante os 30 dias de tratamento dos animais.

4.5 – Análises dos parâmetros Bioquímicos do Soro e Plasma

As dosagens séricas de glicose, triacilgliceróis e ureia foram realizadas utilizando kits comerciais do laboratório LABTEST® (Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

4.6- Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Para avaliar a atividade da superóxido dismutase, 100 mg de tecido pancreático foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato pH 7,2. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C, e o sobrenadante retirado para ser utilizado como amostra biológica. Para a realização da dosagem utilizou-se 30 µL de sobrenadante diluído no tampão (20x) com adição de MTT, tampão e pirogalol. A placa de ELISA foi incubada em estufa a 37°C por 5 minutos. A reação iniciou-se pela adição de 150 µL de DMSO em todos os poços. A absorbância foi medida a 570 nm através do leitor de placa de ELISA (Biotek ELx808).

4.7– Atividade da Catalase (CAT)

A determinação da atividade da enzima catalase é baseada na sua capacidade de clivar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio molecular, conforme descrito por AEBI (1984). Um fragmento de 100 mg de tecido pancreático foi homogeneizado em 1 mL de tampão fosfato 100mM, (pH 7,2) e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. Foram adicionados 50 μ L de tampão fosfato 100 mM, (pH 7,2) e 40 μ L de água destilada e 10 μ L da amostra. A reação deu início pela adição de 990 μ L de H_2O_2 (5 mM). Água destilada foi utilizada como branco e as absorvâncias foram determinadas a cada minuto, durante três minutos, a 240 nm. Uma unidade (U) de catalase é equivalente à hidrólise de 1mol de H_2O_2 ($\epsilon = 39,4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por minuto (AEBI, 1984). A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer e é representada em $\mu\text{mol/mL}$ de amostra. A absorvância utilizada para o cálculo foi o delta obtido das duas absorvâncias lidas (absorvância final – absorvância inicial).

4.8 – Proteína Carbonilada

Proteína carbonilada é um marcador da oxidação de proteína por EROs. Pode ser mensurada por métodos sensitivos que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Este método reage com grupos carbonílicos gerando a hidrazona correspondente, podendo ser analisada espectrofotometricamente. A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada foi realizada em pâncreas conforme descrito por Levine et al. (1994). Para realização da dosagem, 200 mg de tecido pancreático foram homogeneizados em 2 mL de tampão fosfato 50 mM, (pH 6,7) e em seguida centrifugado a 10000rpm por 15 minutos à 4°C. O sobrenadante foi retirado e utilizado como amostra biológica. As absorvâncias foram determinadas a 370 nm e os resultados foram expressos em nmol de PTNcarbonilada/mg de PTN. O conteúdo de DNPH incorporado foi calculado utilizando o coeficiente de extinção molar do DNPH ($22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), segundo a lei de Lambert Beer.

4.9– Análise Estatística

A análise estatística foi feita primeiramente submetendo todos os dados ao teste de normalidade Kolmogorov–Smirnov. Posteriormente os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (dados paramétricos). Após o teste de normalidade, utilizou-se como método estatístico o *One-Way* ANOVA com $p < 0,05$ e múltiplas comparações utilizando o

teste de Bonferroni. Foi empregado o software GraphPad Prism versão 6 para análise dos resultados.

Foi considerado:

* Diferença estatística entre o grupos CxD;

Diferença estatística entre o grupo DxDS50 e/ou DxDS100;

& Diferença estatística entre o grupo CxDS50 e/ou CxDS100;

&& Diferença estatística entre os grupos DS50xDs100.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ainda que novas pesquisas tenham surgido juntamente com novos fármacos, se faz necessário a busca por novas substâncias que possam tornar a terapia farmacológica do DM1 mais efetiva. Sendo assim, analisamos a silimarina (*silybum marianum*) em ratas diabéticas por possuir um caráter antioxidante capaz de restaurar a homeostase metabólica no que diz respeito aos parâmetros antropológicos, bioquímicos e de estresse oxidativo (SOTO *et al.*, 2004).

Inicialmente os animais foram pesados no intuito de avaliar tanto o modelo experimental quando o tratamento com silimarina em ambas as doses.

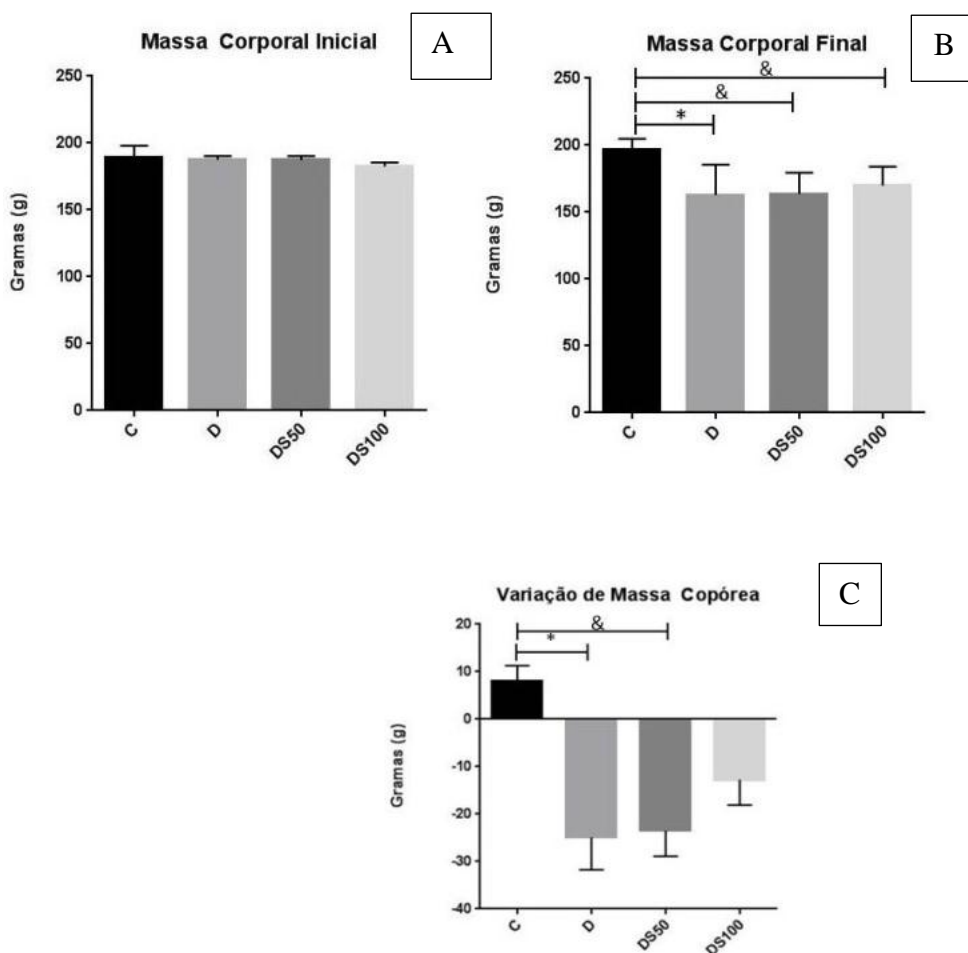


Figura 2: Análise da massa corpórea dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (A) Massa referente ao início do tratamento em gramas; (B) Massa ao final do tratamento em gramas; (C) Variação das massas finais e iniciais entre os grupos ao final do tratamento em gramas. (C) grupo controle, (D) grupo diabético não tratado, (DS50) grupo diabético tratado com a dose de 50mg/Kg de silimarina, (DS100): grupo diabético tratado com silimarina na dose de 100mg/Kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados por One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

* Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D.

& Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e/ou grupo C com o grupo DS100

Sendo assim, a figura 2 mostra a média das massas corpóreas inicial (painel A) e final (painel B) bem como a variação de massa corpórea ao longo dos 30 dias de tratamento com silimarina (painel C). Podemos observar que não houve diferença significativa entre as massas iniciais (painel A) entre os diferentes grupos experimentais. Já no painel B podemos observar que houve uma diminuição significativa da massa corpórea final entre os grupos diabéticos (D, DS50 e DS100) quando comparado ao grupo C. No painel C, observamos que houve uma perda significativa de massa corpórea no grupo D quando comparado ao grupo C e não observamos diferença significativa entre os grupos D, DS50 e DS100.

Estes resultados estão de acordo com o modelo de DM1, uma vez que se sabe que o este não tratado com a insulina apresenta uma perda de massa corpórea devido a lipólise e proteólise acentuadas. Sendo assim torna-se interessante um tratamento que possa minimizar a perda de massa corpórea, uma vez que isto poderá refletir na melhora da homeostase metabólica. O tratamento com a silimarina nas doses de 50 mg/Kg e 100 mg/Kg não foram eficazes em proteger o animal deste catabolismo exacerbado, apesar de observarmos uma tendência à preservação da massa corpórea no grupo tratado com silimarina na dose de 100mg/Kg.

A teoria que explica a maior diminuição de massa corpórea no grupo diabético sem tratamento é a ativação de mecanismos como lipólise e proteólise devido à carência energética desencadeada pela depleção total de insulina no organismo. Estas alterações metabólicas além de levar à perda de peso, também conduz o organismo ao quadro de cetoacidose diabética (GLICONLINE, 2016). Este perfil foi observado nos resultados de Lerco e outros (2003) e Costa (2013) que observaram no grupo diabético sem tratamento uma perda de peso significativa.

Visto que as células não estão recebendo quantidades suficientes de energia através da glicose, o organismo começa a interpretar que não está sendo ingerido nenhum alimento, estimulando constantemente a sensação de fome no DM1 (GLICONLINE, 2016).

Tendo em vista que a insulina é um hormônio anabólico e no DM1 se apresenta deficiente, esta propicia o surgimento de processos catabólicos como glicogenólise (KITABCHI *et al.*, 2004). Através desta, ocorre o aumento da osmolaridade pelo excesso de fluidos que passam do espaço intra para o extracelular desenvolvendo uma desidratação celular. Dessa maneira, quando ultrapassa o limiar renal começam a surgir manifestações de glicosúria e diurese osmótica, perdendo o volume extracelular de água (MARSHALL *et al.*, 1997).

Com isso, ao analisar a ingestão alimentar e hídrica (figura 3 – painel A e B) percebemos que houve diferença estatística entre o grupo C em relação ao grupo D e entre o grupo D em relação aos grupos DS50 e DS100. A ingestão hídrica foi maior no grupo D em relação ao grupo C e os tratamentos.

Além disso, os grupos tratados (DS50 e DS100) ingeriram uma quantidade menor de água comparado ao grupo D (painel A). De forma semelhante, no painel B o consumo de ração foi maior no grupo D em relação ao grupo C e aos grupos tratados (DS50 e DS100). Estes resultados sugerem que as doses de silimarina utilizadas agiram satisfatoriamente nesses parâmetros.

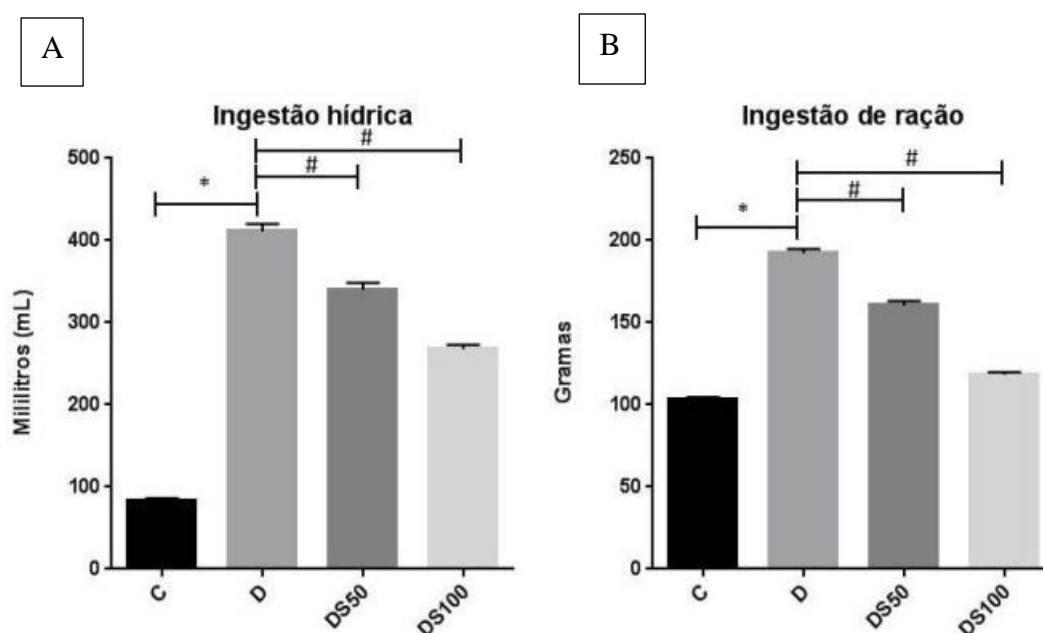


Figura 3: Avaliação da ingestão hídrica e alimentar dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (A) Ingestão hídrica e (B) Ingestão de ração dos grupos experimentais durante o período de tratamento onde (C) grupo controle, (D) grupo diabético tratado com veículo, (DS50) grupo diabético tratado com silimarina na dose de 50/Kg, (DS100) grupo diabético tratado com silimarina na dose de 100mg/Kg. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados por One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,5$.

* Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D.

Diferença estatística entre o grupo D e o grupo DS50 e entre o grupo D e o grupo DS100.

De forma semelhante, Lercio e outros (2003) também constatou que a ingestão alimentar e hídrica foi maior no grupo diabético em relação ao grupo sadio.

Era esperado que o grupo D tivesse maior ingestão hídrica e de ração. De forma semelhante, o grupo DS50 recebeu uma dose menor de silimarina, ingerindo mais água e

ração do que o grupo DS100 que recebeu maior dose do antioxidante. Desta forma, é possível observar que o grupo DS100 dentre os grupos D e DS50 foi o que menos ingeriu água e ração, seguido do grupo DS50 e o grupo D. Essas análises sugerem que a silimarina foi efetiva para diminuir a polifagia e a polidipsia, sintomas característicos do DM1.

Prosseguindo a validação do modelo experimental, seguimos para análise dos parâmetros bioquímicos para avaliar o tratamento recebido com a silimarina bem como avaliar o modelo experimental de DM1. Como se pode observar na figura 4, a glicemia foi maior entre o grupo D em relação ao grupo C. Não houve diferença estatística entre o grupo D em relação ao DS50 e DS100. Houve um aumento da concentração de glicose nos grupos diabéticos tratados ou não com silimarina em relação ao grupo C. Além disso, podemos perceber que a concentração de glicose foi maior no grupo DS100 em relação ao grupo DS50. Não houve diferença estatística entre D e os tratamentos.

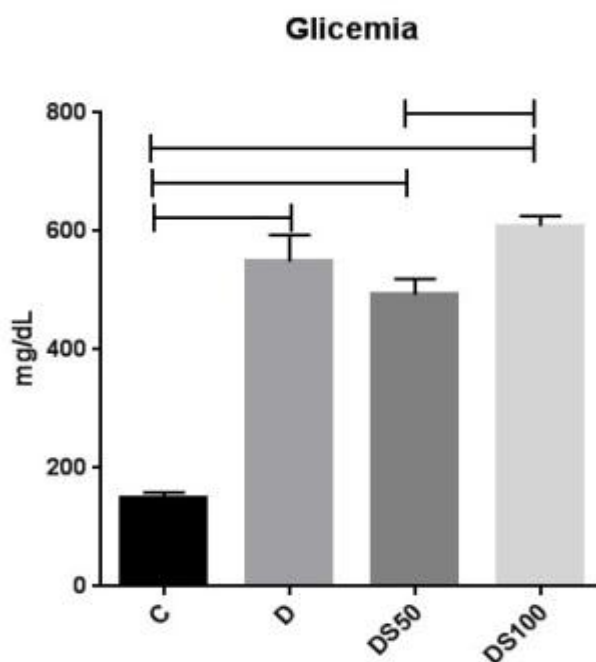


Figura 4: Avaliação da glicemia dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (C) Controle; (D) Diabetes não tratado; (DS50) grupo diabético tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) grupo diabético tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

* Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D.

& Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e grupo C com o grupo DS100

&& Diferença estatística entre o grupo DS50 e DS100.

A glicemia elevada no grupo D valida o modelo experimental de DM1, já que não há insulina presente para transportar a glicose para o meio intracelular, aumentando sua

concentração na circulação sanguínea, levando à hiperglicemia.. O estado hiperglicêmico característico do grupo diabético também foi observado nos resultados de Costa (2013).

Da forma semelhante, Henriques e outros (2013) também observaram uma glicemia maior no grupo diabético em relação ao grupo controle.

Devido à insulinopenia e possíveis complicações renais desencadeadas pelo DM1, faz-se necessário a dosagem de ureia, um dos parâmetros responsáveis por indicar quando o rim não está exercendo sua função adequadamente (DALAPICOLA, 2013).

O aumento de ureia observado no grupo diabético é esperado, já que no diabetes há um aumento da proteólise muscular que eleva a quantidade de aminoácidos que são transportados para o fígado. Sendo assim, há um aumento de compostos catabólicos nitrogenados no tecido hepático, tais como creatinina e ureia (JÚNIOR, 2005).

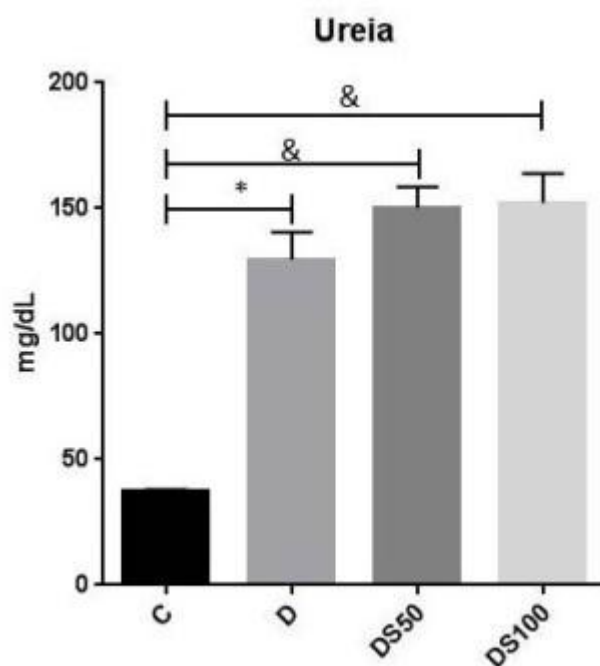


Figura 5: Avaliação dos níveis de ureia dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina.(C) controle; (D) diabetes; (DS50): diabetes tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) diabetes tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

* Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D.

& Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e grupo C com o grupo DS100.

De acordo com a figura 5 é possível perceber que a concentração de ureia foi maior nos grupos diabéticos tratados ou não com silimarina. Entretanto, não há diferença estatística entre os grupos D, DS50 e DS100. Estes resultados reforçam que o aloxano é um fármaco

apropriado para induzir os sintomas do DM1, mas a silimarina não foi eficaz para modular este parâmetro.

Esses dados podem ser observados de modo similar nos resultados de Vessal e outros (2010) onde a concentração de ureia foi maior no grupo diabético em relação ao controle. Já o grupo diabético tratado com silimarina apresentou concentração de ureia menor do que o grupo diabético não tratado, diferentemente dos nossos resultados. Isto pode ser devido à linhagem de ratos Sprague-Dawley utilizada no estudo de Vessal e outros (2010) que reagiu diferentemente ao tratamento com a silimarina enquanto que a nossa linhagem Fisher não obteve resultados satisfatórios.

Além de alterar o mecanismo fisiológico da ureia, a insulinopenia gera um aumento da lipólise no tecido adiposo sendo responsável pela elevação dos níveis de ácidos graxos circulantes saturando a capacidade do fígado em oxidá-los em corpos cetônicos através da cetogênese. Devido à isso, o excesso de ácidos graxos acabam sendo direcionados para a síntese de triglicérides que são eliminados através da enzima lipase lipoproteica e dependem da concentração de insulina no organismo. Em animais com DM1 como não há insulina circulante, a enzima é inibida, favorecendo o quadro de hipertrigliceridemia uma vez que não há quantidades de lipase lipoproteica suficientes para depurar a alta concentração de triglicérides (CONTRERAS *et al.*, 2000).

Dito isso, em relação à concentração de triglicérides, podemos observar na figura 6 a concentração de ureia foi significativamente maior nos grupos tratados com silimarina em relação ao grupo C. Além disso, entre os grupos D, DS50 e DS100 não foram verificadas diferenças estatísticas, apesar de observarmos uma tendência a hipertrigliceridemia nos grupos diabéticos.

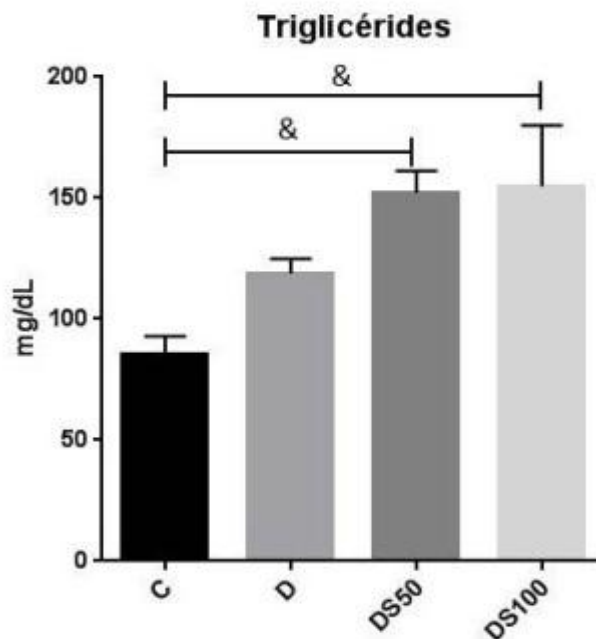


Figura 6: Avaliação dos triglicérides dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (C) controle; (D) diabetes; (DS50): diabetes tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) diabetes tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

& Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e grupo C com o grupo DS100

Esses dados podem ser encontrados similarmente na literatura de Tuorkey e outros (2015) onde observaram que em ratos inicialmente houve um aumento dos níveis de triglicérides no grupo diabético tratado com silimarina e não tratado.

Em contrapartida, Tuorkey e outros (2015) observaram que posteriormente apenas o grupo tratado com silimarina conseguiu diminuir a concentração de triglicérides no organismo. Hipoteticamente podemos sugerir que este resultado difere do observado neste estudo, o que pode ser justificado pelo uso de uma dose de silimarina maior (120 mg/Kg) à que foi utilizada em nosso estudo (50 e 100 mg/Kg). Além disso, o tratamento de Tuorkey e outros (2015) durou 10 dias enquanto dos grupos DS50 e DS100 duraram 30 dias. Eventualmente, devido ao menor tempo de exposição dos ratos utilizados no estudo de Tuorkey e outros (2015) ao estresse hiperglicêmico, isto pode ter gerado uma lipólise menos intensa no tecido adiposo no grupo diabético tratado com silimarina.

Devido à hiperglicemia crônica, surgem EROs que são substâncias instáveis e altamente reativas que são sintetizadas em quase todas as nossas células alterando a fisiologia e a função destas uma vez que podem oxidar tanto componentes celulares como moleculares

(GRIENGLING *et al.*, 2016). Para analisar o *status redox* do organismo é necessário quantificar enzimas antioxidantes que são capazes de proteger o organismo dos ataques dessas substâncias, como CAT e SOD (GRIENGLING *et al.*, 2016). Além disso, analisamos o biomarcador de dano proteico, proteína carbonilada.

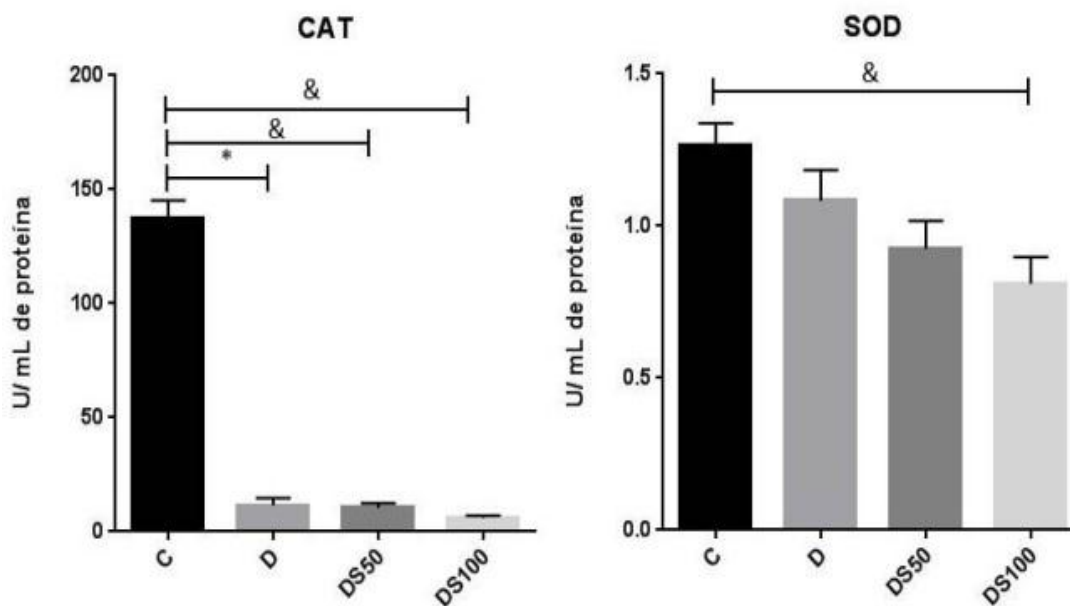


Figura 7: Avaliação da atividade de SOD e CAT em animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (A) Atividade de CAT e (B) Atividade de SOD durante o período de tratamento onde (C) grupo controle, (D) grupo diabético, (DS50) diabetes tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) diabetes tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

* Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D.

& Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e/ou grupo C com o grupo DS100.

Os resultados descritos na figura 7 no painel A mostram que a atividade de CAT permaneceu maior no grupo C em relação aos grupos D, DS50 e DS100. Além disso, não foi observada diferença estatística entre os grupos D, DS50 e DS100. Quanto ao painel B, não foi observada diferença estatística entre o grupo C em relação ao D e do grupo D em relação aos grupos DS50 e DS100, mas a atividade de SOD foi maior no grupo C em relação ao grupo DS100. Desta forma, ambas as doses de silimarina não atuaram de forma efetiva na modulação da atividade de CAT e SOD.

Vessal e outros (2010) encontraram valores de CAT menores no grupo diabético comparado com o grupo controle. Além disso, constatou-se que a silimarina possuiu a capacidade de aumentar a atividade da CAT em ratos diabéticos tratados. Ainda, Vessal e

outros (2010) observaram que valores de SOD renal no grupo diabético foram menores do que os valores do grupo controle.

Presumivelmente a atividade da silimarina pode ter sido divergente porque na literatura de Vessal e outros (2010) tanto SOD quanto CAT foram mensurados nos rins enquanto em nosso trabalho as dosagens foram feitas no pâncreas. Isso sugere que os tecidos reagiram de modo diferente e específico ao estresse oxidativo e ao tratamento com a silimarina, obtendo resultados diferentes. Além disso, a diminuição de SOD pode ser devido à peroxidação lipídica e síntese aumentada de espécies reativas de oxigênio (KIM *et al.*, 2009).

Além de dosar antioxidantes enzimáticos é interessante analisar a oxidação de proteínas através da proteína carbonilada a fim de observar se houve dano significativo no tecido pancreático. Na figura 8 pode-se observar que não houve diferença significativa entre o grupo C e o grupo D. Entretanto, a concentração de proteína carbonilada foi maior no grupo D em relação aos grupos DS50 e DS100.

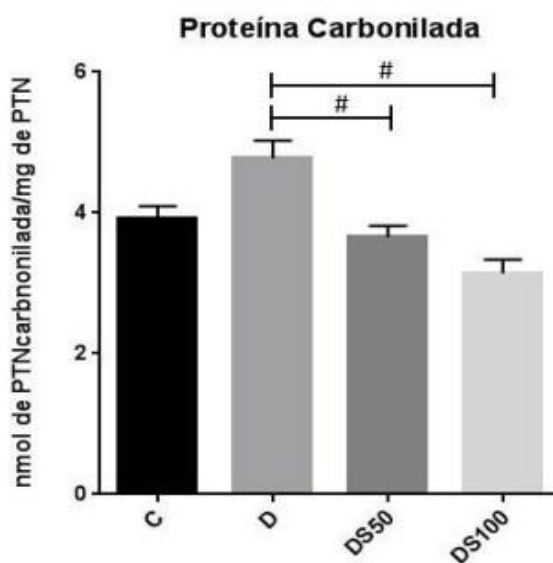


Figura 8: Avaliação dos níveis de proteína carbonilada dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. (C) grupo controle, (D) grupo diabético, (DS50) diabetes tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) diabetes tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$.

Diferença estatística entre o grupo D e o grupo DS50 e entre o grupo D e o grupo DS100.

Os grupos DS50 e DS100 possuem valores de proteína carbonilada menores que o grupo D, já que ambos receberam tratamento. Os nossos resultados sugerem que a silimarina sendo um composto antioxidante pode ter atuado satisfatoriamente nos grupos DS50 e DS100 reduzindo a oxidação de proteínas, obtendo valores de proteína carbonilada menores.

Resultados semelhantes podem ser observados na literatura de Shokrzadeh e outros (2018) que perceberam que o grupo de camundongos diabéticos apresentaram níveis maiores de oxidação de proteínas em relação ao grupo controle. A silimarina foi um eficiente antioxidante que neutralizou as espécies reativas de oxigênio evitando danos às proteínas, de maneira independente das atividades das enzimas CAT e SOD, já que a atividade delas estava reduzida nos grupos diabéticos tratados. Sendo assim, pela análise em conjunto dos resultados podemos inferir que o mecanismo responsável pela proteção do pâncreas nos grupos tratados com a silimarina possa ser a neutralização direta das EROs ou a atuação em outras enzimas antioxidantes que não foram quantificadas neste estudo, como a glutathiona peroxidase (BAYNE; THORPE, 1999).

Tendo em vista a importância das ilhotas pancreáticas na restauração das CBP de modo a sintetizar insulina e na fisiopatologia do DM1, torna-se relevante a análise do número e área das ilhotas pancreáticas dos grupos experimentais.

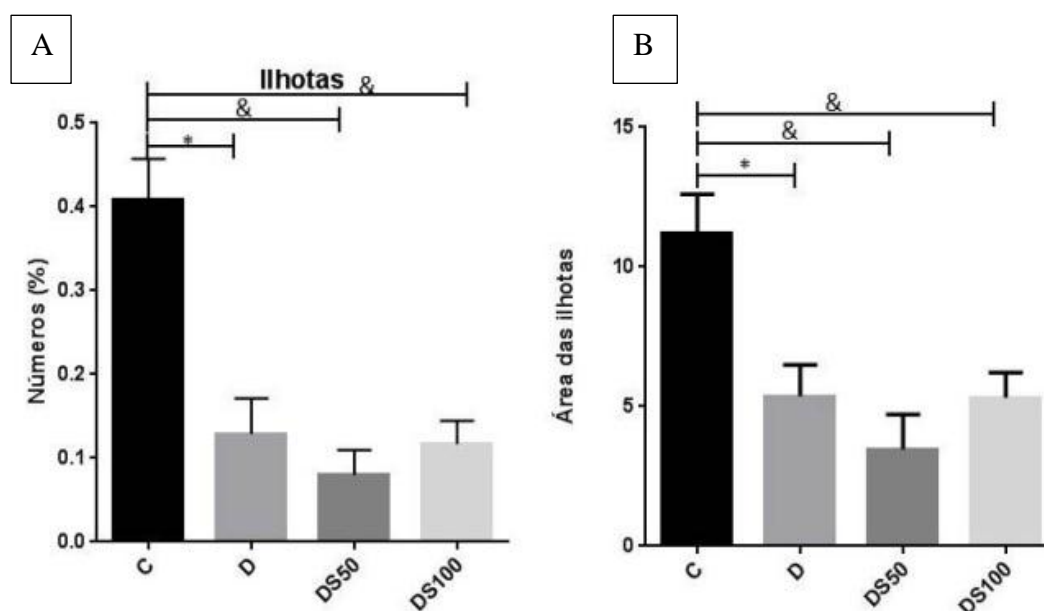


Figura 9: Avaliação do número e área das ilhotas pancreáticas dos animais não diabéticos e diabéticos tratados ou não com silimarina. Análise do número de ilhotas dos grupos experimentais onde (C) grupo controle, (D) grupo diabético, (DS50) diabetes tratado com dose de 50mg/Kg de silimarina e (DS100) diabetes tratado com dose de 100mg/kg de silimarina. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste One Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Bonferroni. Foi considerado $p < 0,05$. * Diferença estatística entre o grupo C e o grupo D. & Diferença estatística entre o grupo C e o grupo DS50 e grupo C com o grupo DS100.

Através da figura 9 – painel A e B pode-se perceber que o grupo C possui um número de ilhotas e área maior que o grupo D, o que é esperado tendo em vista que são ratos saudáveis. Dentre os grupos D, DS50 e DS100 não houve diferença estatística. Devido ao seu potencial antioxidante, esperava-se que a silimarina atuasse no tecido pancreático reestabelecendo a quantidade de ilhotas.

Este fato é contrastado pela literatura de Soto e outros (2014) e Amniattalab e outros (2016) em que observaram que no grupo diabético tratado com silimarina houve uma restauração dos números de ilhotas pancreáticas em relação ao grupo diabético não tratado.

Essa discordância pode ser pelo tempo de tratamento que nesse trabalho foi de 30 dias enquanto no trabalho de Soto e outros (2014) foi de 63 dias. Além disso, a concentração de silimarina foi de 200 mg/kg enquanto no nosso foi de 50 mg/kg e 100 mg/kg. A hipótese é que com um tempo maior de ação e com a concentração mais elevada, a silimarina atuou de forma mais satisfatória no restabelecimento da função das ilhotas dos ratos diabéticos.

6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista que o Diabetes Mellitus vem crescendo consideravelmente nos últimos anos fazem-se necessárias novas pesquisas a fim de descobrir novos fármacos para a terapia medicamentosa complementar, já que a insulino-terapia é invasiva, não tornando-a totalmente eficaz.

O foco do nosso trabalho foi o diabetes tipo 1 onde há perda total das células beta pancreáticas levando a um quadro de insulinopenia. Diversos estudos mostram que a hiperglicemia crônica é responsável por gerar espécies reativas de oxigênio causando um desequilíbrio redox no organismo, podendo alterar o metabolismo e a fisiologia celular. Essas alterações são responsáveis pelas complicações micro e macrovasculares característicos do DM1.

O uso de fitoterápicos é uma prática antiga e atualmente é muito utilizada para tratar algumas doenças. Neste trabalho foi avaliado o efeito da silimarina na modulação do desequilíbrio redox em modelo experimental de DM1.

O DM1 foi confirmado pelo aumento da glicemia, ingestão hídrica e de ração, além da perda de peso dos animais. O tratamento com a silimarina não alterou os níveis séricos de glicose, ureia e triglicérides em ratas diabéticas. Além disso, a silimarina não alterou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase no pâncreas das ratas diabéticas. Ainda, a silimarina não alterou o número e a área das ilhotas pancreáticas das ratas diabéticas. Contudo, a silimarina alterou os níveis de proteína carbonilada do pâncreas das ratas diabéticas.

7 - CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a silimarina não foi eficaz em melhorar os parâmetros bioquímicos e o *status redox* no pâncreas de ratas diabéticas. Fazem-se necessários mais estudos com a silimarina para elucidar seu potencial terapêutico no DM1.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTI, K.G.M.M.; ZIMMET, P.Z. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. **Diabetic Medicine**, (si), v. 15, p.539-553, abr. 1998.

AMNIATTALABA, Amir et al. Silymarin: A Novel Natural Agent to Restore Defective Pancreatic β Cells in Streptozotocin (STZ)-induced Diabetic Rats. **Iranian Journal Of Pharmaceutical Research**, Si, v. 3, n. 15, p.493-500, maio 2016.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Si: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2018. 160 p.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p.629-643, ago. 2010.

CALLES-ESCANDON, Jorge; CIPOLLA, Marilyn. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective. **Endocrine Reviews**, [s.l.], v. 22, n. 1, p.36-52, 1 fev. 2001.

CAÑIBANO-HERNÁNDEZ, Alberto *et al.* Current advanced therapy cell-based medicinal products for type-1-diabetes treatment. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 543, n. 1-2, p.107-120, maio 2018.

CAPASSO, Francesco et al. **A quick reference to herbal medicine**. Springer Verlag 2003.

CONTRERAS F *et al.* Diabetes e Hipertensión Aspectos Clínicos yTerapêuticos. Arch Vzlanos Farmacol Terap 2000;19:9-24.

CORTEZ, Daniel Nogueira et al. Complicações e o tempo de diagnóstico do diabetes mellitus na atenção primária. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.250-255, jun. 2015.

DEHMLOW, Carola; GROOT, Jochen Erhardherbert de; GROOT, Herbert de. **Inhibition of Kupffer Cell Functions as an Explanation for the Hepatoprotective Properties of Silibinin**. **Hepatology**, [s.i], v. 23, n. 4, p.749-754, abr. 1996.

EPIDEMIOLOGIA E PREVENÇÃO DA DIABETES MELLITUS. Disponível em < <http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-tipo-2/001-Diretrizes-SBD-Epidemiologia-pg1.pdf> >. Acesso em 07 de maio de 2018.

FERNANDES, Sheila Marques et al. **The role of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats**. Archives Of Endocrinology And Metabolism, [s.l.], v. 60, n. 5, p.443-449, out. 2016.

GÓES, Anna Paula P.; VIEIRA, Maria Rita R.; LIBERATORE JÚNIOR, Raphael del Roio. **Diabetes mellitus tipo 1 no contexto familiar e social**. Paul Pediatría, [s.i], v. 8, n. 2, p.124-128, 05 abr. 2007.

GOLBERT, Airton *et al.* *Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo: Editora Clannad, 2017.*

GRIENGLING, Kathy K. *et al.* Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System. *Circulation Research*, [s.l.], v. 119, n. 5, p.1-76, 19 ago. 2016.

GROSS, Jorge L. *et al.* **Diabetes Melito**: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, [s.l.], v. 46, n. 1, p.16-26, fev. 2002.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal Of Pharmacology**. Singapore, p. 231-255. jun. 2004.

IGHODARO, Osasenaga Macdonald; ADEOSUN, Abiola Mohammed; AKINLOYE, Oluseyi Adeboye. Alloxan-induced diabetes, a common model for evaluating the glycemic-control potential of therapeutic compounds and plants extracts in experimental studies. **Sciencedirect**, Si, v. , n. , p.365-374, 08 fev. 2018.

JÚNIOR, Hernani Pinto de Lemos; LEMOS, André Luis Alves de. Silimarina. **Diagn Tratamento**, São Paulo, v. 1, n. 17, p.18-20, 30 nov. 2011.

KACHIKIS, Alisa *et al.* **Gestational diabetes mellitus**: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunization safety data. *Vaccine*, [s.l.], v. 35, n. 48, p.6555-6562, dez. 2017.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, Si, v. 51, n. 2, p.216-226, 18 dez. 2007.

LENZEN, Sigurd; MUNDAY, Rex. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its *N*-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. **Biochemical Pharmacology.**, Si, v. 42, n. 7, p.1385-1392, 19 maio 1991.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, Si, v. 31, n. 1, p.337-342, 7 maio 1988.

LORENZI H, MATOS FJA. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. 2ª Ed. São Paulo. 2008.

MUNDAY, R. Dialuric acid autoxidation. Effects of transition metals on the reaction rate and on the generation of "active oxygen" species. **Biochem Pharmacol.**, Si, v. 37, n. 3, p.409-413, 1 fev. 1988.

OLIVEIRA, José Egídio Paulo de; JÚNIOR, Renan Magalhães Montenegro; VENCIO, Sérgio (org.). *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*. São Paulo. EDICLANNAD, 2017. *E-book*. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/2017/diretrizes/diretrizes-sbd-2017-2018.pdf>. Acesso em 10 de junho de 2019.

PAIVA, Carlos Henrique Assunção; TEIXEIRA, Luiz Antonio. Reforma sanitária e a criação do Sistema Único de Saúde: notas sobre contextos e autores. **História, Ciências, Saúde-manguinhos**, [S.I.], v. 21, n. 1, p.15-36, mar. 2014

PATEL, Hemang et al. Hyperglycemia induces differential change in oxidative stress at gene expression and functional levels in HUVEC and HMVEC. **Cardiovascular Diabetology**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.142-146, 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-12-142>.

PEREIRA, Aron Silva et al. Influência do treinamento físico aeróbio nos marcadores séricos de estresse oxidativo em ratos diabéticos. **Journal Of Physical Education**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.2726-2736, 12 maio 2016.

REIS, Janice Sepúlveda et al. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.1096-1105, out. 2008

REWERS M, KLINGENSMITH GJ. Prevention of type 1 Diabetes. **Diabetes Spectr**; 10(4): 282-92, 1997

ROJAS, Joselyn et al. Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy. **Journal Of Diabetes Research**, [s.l.], v. 2018, p.1-19, 2018.

ROSS, S.M. **Milk thistle (Silybum marianum)**: an ancient botanical medicine for modern times. *Holist Nurs Pract*, v.22, n.5, p.299-300. 2008.

SALAMONE F. et al. **Silibinin improves hepatic and myocardial injury in mice with nonalcoholic steatohepatitis**. *Dig Liver Dis: Official Journal Of The Italian Society Of Gastroenterology And The Italian Association For The Study Of The Liver* 2012b;44(4):334-42.

SIMÕES, CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre (RS): Editora da UFRGS, Florianópolis: 2007.

SOTO, C. et al. **Effect of silymarin on kidneys of rats suffering from alloxan-induced diabetes mellitus**. *Phytomedicine*, [s.l.], v. 17, n. 14, p.1090-1094, dez. 2010.

SOTO, C. et al. Effect of Silymarin in Pdx-1 expression and the proliferation of pancreatic β -cells in a pancreatectomy model. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.233-239, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.008>.

STINEFELT, Beth et al. Free Radical Scavenging, DNA Protection, and Inhibition of Lipid Peroxidation Mediated by Uric Acid. **Annals Of Clinical & Laboratory Science**, (si), v. 31, n. 1, p.37-45, jun. 2005.

STOLF am. 2016. **Efeitos da silimarina sobre a angiogênese e estresse oxidativo em camundongos normoglicêmicos e diabéticos**. Thesis of Pharmacology Doctorate Degree. UFPR. Curitiba, PR, Brazil. 2016.

STOLF, Aline Maria; CARDOSO, Cibele Campos; ACCO, Alexandra. Effects of Silymarin on Diabetes Mellitus Complications: A Review. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 31, n. 3, p.366-374, 25 jan. 2017.

TIWARI, Brahm Kumar et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal Of Biomarkers**, [s.l.], v. 2013, p.1-8, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/378790>.

TRAPPOLIERE, M., CALIGIURI, A., SCHMID, M., BERTOLANI, C., FAILLI, P., VIZZUTTI, F., NOVO, E., DI MANZANO, C., MARRA, F., LOGUERCIO, C. e PINZANI, M. **Silybin, a component of sylimarin, exerts anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects on human hepatic stellate cells**. *J Hepatol*, v.50, n.6, p.1102-1111. 2009.

WEAVER, Daniel C. et al. Insulin Release from Isolated Rat Islets of Langerhans. **Diabetes**, Si, v. 27, n. 12, p.1205-1214, 17 jul. 1978.

YOON, Ji-Won; JUN, Hee-Sook, H. Autoimmune Destruction of Pancreatic b Cells. **American Journal Of Therapeutics**, [s.l.], v. 12, n. 6, p.580-591, nov. 2005. ZHAO, Lingjie. **Effects of Free Radicals in Diabetes**. 2001. (Dissertação Mestrado) - Faculdade de Radiation Biology, Radiology, The University Of Iowa, Iowa City, 2001.