

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DE SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA**

**Efeitos da Administração da Orgoteína (Superóxido  
Dismutase Exógena) sobre o Estresse Oxidativo  
Hepático em Ratos Diabéticos**

**Fábio Cangeri Di Naso**

Porto Alegre – RS, 2010.

**Fábio Cangeri Di Naso**

**Efeitos da Administração da Orgoteína (Superóxido  
Dismutase Exógena) sobre o Estresse Oxidativo  
Hepático em Ratos Diabéticos**

**Orientadora:** Norma Anair Possa Marroni

*Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.*

Porto Alegre – RS, 2010.

Isto sabemos,  
todas as coisas estão ligadas  
como o sangue  
que une uma família.  
Tudo o que acontece com a Terra,  
acontece com os filhos e filhas da Terra.  
O homem não tece a teia da vida;  
ele é apenas um fio.  
Tudo o que faz à teia,  
ele faz a si mesmo.

*TED PERRY, inspirado no Chefe Seattle*

## **AGRADECIMENTOS**

À Juliana Saraiva Pereira, meu principal incentivo, e, além disso, exemplo de companheira, amiga e mulher, dedico este trabalho.

Ao meu pai e maior mestre, Basílio Di Naso, que, apesar de ter passado pouco tempo comigo, conseguiu me ensinar os valores essenciais da vida.

À minha mãe, Rosmary Cangeri Di Naso, e a meu irmão, Bruno Cangeri Di Naso, pelo carinho de terem sempre me ajudado e me incentivado a continuar batalhando.

Aos meus colegas de Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia, sem o auxílio dos quais não teria iniciado nem finalizado esta pesquisa, agradeço muito pelo companheirismo e auxílio no decorrer do trabalho.

Aos meus mestres e amigos, Alexandre Simões Dias, Adriane Dal Bosco e Mariane Borba Monteiro, que me ensinaram valores maiores do que a ciência e que, acreditando em mim, me ajudaram muito, agradeço os ensinamentos essenciais à minha formação.

À querida professora e orientadora, Norma Marroni, muito obrigado pela oportunidade proporcionada. Agradeço os incentivos, as críticas e, acima de tudo, o carinho demonstrado por mim e pelos demais alunos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>12</b>
1.1- Diabetes Mellitus .....	15
1.2- A Via dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada (AGEs).....	17
1.3- A Via dos Polióis.....	19
1.4- A Ativação da Proteína Cinase C (PKC).....	20
1.5- A Via da Hexosamina .....	21
1.6-Formação de Espécies Reativas de Oxigênio .....	22
1.7- Defesas Antioxidantes .....	24
1.8- Diabetes Mellitus, Estresse Oxidativo e Antioxidantes .....	26
1.9- Superóxido Dismutase (SOD) e utilização clínica da Orgoteína.....	29
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
2.1- Objetivo Geral.....	31
2.2- Objetivos Específicos .....	31
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1- Animais e protocolo experimental.....	32
3.2- Análises Bioquímicas e Preparo do Homogeneizado .....	33
3.2.1- Avaliação da glicemia .....	33
3.2.2- Preparo dos homogeneizados de fígado .....	33
3.2.3- Obtenção da Fração Citosólica .....	34
3.2.4- Obtenção da Fração Mitocondrial .....	34
3.2.5- Dosagem de proteínas.....	34
3.3- Determinação do Estresse Oxidativo.....	35
3.3.1- Medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	35
3.3.2- Atividade da Superóxido Dismutase (SOD) .....	36
3.3.3- Atividade da Catalase (CAT).....	36
3.3.4- Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx).....	37
3.3.5- Medida de Nitritos e Nitratos .....	38
3.4- Western blot .....	39
3.5- Análise Estatística .....	40
<b>4- RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1- Peso Corporal e Glicemia.....	41

4.2- Determinação do Estresse Oxidativo.....	42
4.3- Atividades das Enzimas Antioxidantes .....	42
4.4 - Medida dos Nitritos e Nitratos.....	44
4.5- Expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS).....	46
4.6- Expressão da p65 do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) .....	47
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>54</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>62</b>
Artigo 1 .....	62
Artigo 2 .....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Efeitos dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada.....	18
<b>Figura 2:</b> Efeitos fisiológicos e vias moleculares envolvidas na ativação DAG-PKC.....	21
<b>Figura 3:</b> Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (Del Maestro, 1980). .....	25
<b>Figura 4:</b> Principais vias que levam as complicações crônicas do DM.....	28
<b>Figura 5:</b> Medidas das Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	42
<b>Figura 6:</b> Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). .....	43
<b>Figura 7:</b> Atividade da enzima catalase (CAT). .....	43
<b>Figura 8:</b> Atividade da enzima glutatona peroxidase (Gpx). .....	44
<b>Figura 9:</b> Efeito da orgoteína sobre os nitritos e nitratos totais no diabetes <i>mellitus</i> experimental.....	44
<b>Figura 10:</b> Correlação entre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e a medida de nitritos e nitratos totais no DM experimental.....	45
<b>Figura 11:</b> Efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina e da orgoteína na análise de Western blot da proteína iNOS no fígado. As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS a 12% e incubadas com anticorpo anti-iNOS.....	46
<b>Figura 12:</b> Efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina e da orgoteína na análise de Western blot da proteína p65 no fígado. ....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Peso corporal e concentração da glicose sanguínea nos diferentes grupos estudados.....	41
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>α</b>	<b>alfa</b>	<b>mg</b>	<b>miligramas</b>
<b>β</b>	beta	<b>Mn-SOD</b>	superóxido dismutase manganês
<b>γ</b>	gama	<b>nmol</b>	nanomol
<b>μL</b>	microlitro	<b>Na+/K+ ATPase</b>	bomba sódio potássio ATPase dependente
<b>μmol</b>	micromolar	<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>&lt;</b>	menor	<b>NAD</b>	nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>AGE</b>	produtos finais de glicosilação avançada	<b>NADPH</b>	forma reduzida do nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>° C</b>	graus Celsius	<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	bicarbonato de sódio
<b>CAT</b>	catalase	<b>NaOH</b>	hidróxido de sódio
<b>Cdc42</b>	ciclo de divisão celular 42	<b>NF-κB</b>	fator de transcrição nuclear kappa B
<b>cm</b>	centímetros	<b>nm</b>	nanômetro
<b>CNPq</b>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	<b>NO</b>	óxido nítrico
<b>CO</b>	controle	<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	nitritos
<b>CO+ORG</b>	controle + orgoteína	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	nitratos
<b>CML</b>	n(carboximetil)lisina	<b>NOS</b>	enzima óxido nítrico sintase
<b>CuZn-SOD</b>	superóxido dismutase cobre-zinco	<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxigênio singlet
<b>DAG</b>	diacilglicerol	<b>O<sup>-•</sup></b>	ânion radical superóxido
<b>DM</b>	<i>Diabetes mellitus</i>	<b>OH<sup>•</sup></b>	radical hidroxil
<b>DM+ORG</b>	Diabéticos + orgoteína	<b>ONOO<sup>-•</sup></b>	peroxinitrito
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico	<b>OPT</b>	optaldeído
<b>DP</b>	desvio padrão	<b>PAI-1</b>	inibidor do ativador de plasminogênio
<b>ERN</b>	espécies reativas de nitrogênio	<b>PGE<sub>2</sub></b>	prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>ERO</b>	espécies reativas de oxigênio	<b>PBS</b>	tampão salina-sulfato
<b>EDTA</b>	ácido etinodiaminotetracético	<b>PMSF</b>	fluoreto de fenil metilsulfonila
<b>eNOS</b>	óxido nítrico sintase endotelial	<b>PKA</b>	proteína cinase A
<b>Fe</b>	Ferro	<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>g</b>	gramas	<b>pmoles</b>	picomoles
<b>GFAT</b>	glutamina:frutose 6-fosfato amidotransferase	<b>PLA<sub>2</sub></b>	fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>GPx</b>	glutathiona peroxidase	<b>RAGE</b>	receptor dos produtos finais de glicosilação avançada
<b>GRd</b>	glutathiona redutase	<b>RE</b>	retículo endoplasmático
<b>GSH</b>	glutathiona reduzida	<b>ROOH</b>	hidroperóxido alquil
<b>GSSG</b>	glutathiona oxidada	<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>H<sup>+</sup></b>	íons hidrogênio	<b>SDS</b>	solução de dodecil sulfato de sódio
<b>H<sub>2</sub>O</b>	água	<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peróxido de hidrogênio	<b>STZ</b>	estreptozotocina
<b>HAS</b>	hipertensão arterial sistêmica	<b>TBARS</b>	substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico
<b>HGT</b>	hemoglicoteste	<b>TBE</b>	tris-ácidoclórico-EDTA
<b>ICAM-1</b>	molécula de adesão intercelular-1	<b>t-BOOH</b>	hidroperóxido de tert-butila
<b>i.p.</b>	intraperitoneal	<b>TCA</b>	ácido tricloroacético
<b>IL</b>	Interleucina	<b>TE</b>	tampão tris EDTA
<b>iNOS</b>	óxido nítrico sintase induzível	<b>TEMED</b>	tertametil-etilclorodimida
<b>KCl</b>	cloreto de potássio	<b>TGF β</b>	fator de crescimento transformante β
<b>KDa</b>	kilodaltons	<b>TNF-α</b>	fator de necrose tumoral alfa
<b>Km</b>	constante de Michaelis	<b>U/mL</b>	unidade por milimolar
<b>Kg</b>	kilogramas	<b>UFRGS</b>	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
<b>LPO</b>	lipoperoxidação	<b>V</b>	volts
<b>MAP</b>	proteína de ativação mitogênica	<b>VCAM-1</b>	molécula de adesão celular vascular-1
<b>MAPK</b>	proteína cinase de ativação mitogênica	<b>VEGF</b>	fator de crescimento do endotélio vascular

## RESUMO

**Introdução:** O Diabetes Mellitus é doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo. Estudos experimentais sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese e na progressão dela.

**Objetivo:** Investigar os efeitos da utilização exógena do antioxidante orgoteína (SOD Cu/Zn) sobre o estresse oxidativo, ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) e expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática no modelo experimental de diabetes *mellitus* (DM).

**Métodos e Resultados:** Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos: controle (CO), controle tratados com orgoteína (CO+ORG), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com orgoteína (DM+ORG). A dose utilizada da ORG (orgoteína ®) foi de 13 mg/Kg de peso corporal durante os sete últimos dias de experimento através de injeção subcutânea. O DM foi induzido por injeção de estreptozotocina (i.p., 70 mg/kg) e, após sessenta dias, foi avaliada a lipoperoxidação hepática através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS- nmoles/mg de proteína), a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT-pmoles/mg de proteína), superóxido dismutase (SOD-U/mg de proteína) e glutathione peroxidase (GPx- nmoles/mg de proteína). Também foi realizada a medida de nitritos e nitratos (mM de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub>). As expressões da p65 do NFκB e da iNOS foram avaliadas pela técnica de *Western blot* e quantificadas por densitometria em relação à percentagem do controle.

**Resultados:** Houve aumento na lipoperoxidação hepática no grupo DM e redução significativa no grupo DM+ORG (0,36±0,15 vs 0,18±0,04; p<0,01). A atividade da enzima CAT apresentou aumento no grupo DM e redução

significativa no grupo DM+ORG ( $p < 0,001$ ), enquanto a atividade da SOD e da GPx apresentaram redução no DM e aumento no grupo DM+ORG, respectivamente ( $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ). A medida de nitritos e nitratos apresentou redução no DM e aumento no grupo DM+ORG ( $1,47 \pm 0,61$  vs  $2,29 \pm 0,20$ ;  $p < 0,05$ ) enquanto a expressão da iNOS foi 32% maior no grupo DM em relação ao grupo CO e 53% maior no grupo DM+ORG, quando comparado com o grupo DM ( $p < 0,01$ ). A p65 foi 37% mais expressa no DM ( $p < 0,05$ ) e sem diferença estatística, quando comparado o grupo DM com o grupo DM+ORG.

Conclusão: O tratamento com orgoteína reduziu o estresse oxidativo hepático em animais diabéticos, mesmo não alterando o fator de transcrição nuclear NFκB. A orgoteína também aumentou a bioatividade do NO, provavelmente, devido ao aumento da atividade, dismutando o radical superóxido, e devido ao aumento da expressão da iNOS.

## ABSTRACT

**Aim:** To investigate the effects of exogenous antioxidant orgoteína on oxidative stress, activation of nuclear transcription factor kappa B (NFκB), and hepatic expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the experimental model of diabetes mellitus (DM). **Methods:** 28 male Wistar rats divided in four groups were used: control (CO), controls treated with orgoteína (CO+ORG), diabetics (DM), and diabetics treated with orgoteína (DM+ORG). Orgoteína (orgotein®, 13 mg/Kg body weight was administered subcutaneously for the last 7 days of the trial. DM was induced by a single streptozotocin injection (i.p., 70 mg/kg), and 60 days later, we evaluated liver lipoperoxidation through thiobarbituric acid reactive substances (TBARS- nmoles/mg of protein) and activity of antioxidant enzymes catalase (CAT-pmoles/mg of preotein), superoxide dismutase (SOD-U/mg of protein) and glutathione peroxidase (GPx- nmoles/mg of protein). Nitrites e nitrates (mM NO<sub>2</sub> and NO<sub>3</sub>) were also measured, and p65 of NFκB and iNOS expressions were evaluated by Western blot and quantified by densitometry as compared to control percentage. **Results:** Liver peroxidation was increased in the DM group and significantly decreased in the DM+ORG group (0.36±0.15 vs 0.18±0.04; p<0.01). CAT activity was increased in the DM group and significantly decreased in the DM+ORG group (p<0.001), whereas SOD and GPx activity were decreased in the DM group and increased in the DM+ORG group, respectively (p<0.001 and p<0.05). Nitrite and nitrate measures were reduced in the DM and increased in the DM+ORG group (1.47±0.61 vs 2.29±0.20; p<0.05), while iNOS expression in the DM group was 32% greater than in the CO and 53% greater in the DM+ORG group than in the DM group (p<0.01). P65 expression was 37% higher in the DM (p<0.05), and there was no significant difference between the DM and DM+ORG groups.

Conclusion: Orgoteína treatment reduced liver oxidative stress in diabetic animals, even though it did not change NFκB. Orgoteína also increased NO bioactivity, probably by the increased dismutation of the superoxide radical and by increase in iNOS expression.

## INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo. Essa doença apresenta prevalência bastante elevada nos Estados Unidos e em países da Europa, contudo, o Brasil e outros países em desenvolvimento apresentam crescimento considerável no número de doentes. O crescimento da incidência de DM no Brasil representa importante preocupação da saúde pública, tendo em vista que a doença acomete diversos sistemas corporais com complicações frequentes, decorrentes de alterações teciduais e vasculares, manifestando-se através da doença vascular periférica, doença isquêmica cardíaca e doenças cerebrovasculares.

Estima-se que o número de pessoas com diabetes mellitus aumente de 150 milhões, em 2000, para 220 milhões, em 2010, e 300 milhões, em 2025, (Wild, Roglic *et al.*, 2004). Além disso, a estimativa da prevalência mundial de diabetes mellitus para todos os grupos etários, em 2000, é de 2,8% e, em 2030, de 4,4% (Wild, Roglic *et al.*, 2004). Ainda que a prevalência de obesidade permaneça estável até 2030, o que parece improvável, o número de pessoas com diabetes mellitus será maior do que o dobro em consequência de envelhecimento e urbanização da população. Tais estimativas, provavelmente, estão subestimando os valores reais, visto que dados da Federação Internacional de Diabetes indicam que aproximadamente 246 milhões de pessoas no mundo têm diabetes mellitus, sendo, atualmente, uma das doenças não transmissíveis mais comuns (Unwin, Gan *et al.*).

No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação do DM e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) – (Hiperdia), do Ministério da Saúde, estima-se a existência de seis milhões de diabéticos, metade dos quais faz

acompanhamento nas unidades básicas de saúde. No Rio Grande do Sul, desde o início da implantação do Hiperdia, em 2002, já foram cadastrados e acompanhados 10.763 doentes (Ministério da Saúde, 2009).

Existe crescente interesse na pesquisa experimental com a finalidade de investigar as principais vias fisiopatológicas do diabetes mellitus, principalmente em relação às complicações crônicas da doença. O estresse oxidativo é aceito como fator causal das complicações crônicas, portanto, a pesquisa de tratamentos com antioxidantes possui relevância clínica (Ceriello, 2003). Nosso grupo de pesquisa já trabalhou com o modelo experimental crônico de diabetes mellitus induzido por estreptozotocina e observou o efeito da terapia antioxidante neste modelo. A utilização do antioxidante quercetina demonstrou redução de estresse oxidativo hepático e da via de sinalização redox-dependente ativada neste modelo (Unwin, Gan *et al.*). Recentemente, investigamos o potencial antioxidante do *Agaricus blazei* Murril, também conhecido como “Cogumelo do Sol” (Anexo 1) e da aminoguanidina (Anexo 2) frente às alterações estruturais pulmonares do mesmo modelo. A utilização dessas terapias demonstrou benefícios, reduzindo o estresse oxidativo e melhorando as alterações fisiopatológicas resultantes da indução do diabetes experimental. A realização desses trabalhos projeta a perspectiva de novos estudos que aprofundem o conhecimento sobre a ação da terapia antioxidante no modelo de diabetes experimental.

### **1.1- Diabetes Mellitus**

O Diabetes Mellitus (DM) é doença caracterizada por desordens metabólicas. Apresenta uma característica em comum, a hiperglicemia, a qual ocorre devido a defeitos na secreção e na ação da insulina. Em virtude do crescimento e envelhecimento populacional, urbanização, aumento da prevalência de obesidade e inatividade física, cresce cada vez mais o número de diabéticos em todo o mundo (Zimmet, Alberti *et al.*, 2001). Estima-se que o número de pessoas com DM aumente de 170 milhões, em 2000, para 194 milhões, em 2003, e 334 milhões, em 2030 (Wild, Roglic *et al.*, 2004). No

Brasil, um censo realizado pelo Ministério da Saúde e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), com o apoio da Sociedade Brasileira de Diabetes, demonstrou a prevalência de diabetes de 7,6% na população entre 30 e 69 anos (Ministério da Saúde, 2009).

A classificação do diabetes mellitus está fundamentada nos sinais clínicos apresentados pelos pacientes, que são enquadrados, na maioria dos casos, em duas grandes categorias (American Diabetes Association, 2005). O diabetes do tipo 1 é caracterizado por deficiência absoluta de insulina, causada pela destruição das células  $\beta$ -pancreáticas, relacionada com múltiplas predisposições genéticas e fatores ambientais, ou de etiologias desconhecidas, denominada diabetes idiopática (Bresson e Von Herrath, 2004). O diabetes do tipo 2 é causado por combinação de resistência periférica à insulina e resposta secretora inadequada das células  $\beta$ . Aproximadamente 80% a 90% apresentam diabetes do tipo 2 (American Diabetes Association, 2005).

O diabetes mellitus não controlado apresenta consequências agudas como a hiperglicemia com cetoacidose ou a síndrome hiperosmolar não cetótica. São sintomas característicos de hiperglicemia: poliúria, polidipsia, perda de peso corporal, muitas vezes com hiperfagia, e visão confusa. A hiperglicemia crônica pode acarretar retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e neuropatia autonômica (American Diabetes Association, 2005). Adicionalmente, entre pacientes com diabetes, há elevada incidência de aterosclerose, doença arterial periférica e doença cerebrovascular.

A atual pandemia de DM tem estimulado a realização de pesquisas para elucidar a intrincada fisiopatologia da doença, a fim de que haja melhora na detecção, na prevenção e no tratamento das complicações associadas. Existem quatro hipóteses principais que explicam como a hiperglicemia resulta em complicações diabéticas. São elas: o aumento da formação de produtos finais da glicosilação avançada (do inglês, *Advanced Glycated End-Products* AGEs), o aumento no fluxo da via dos polióis, a ativação de isoformas da proteína cinase C (PKC) e o aumento no fluxo da via da hexosamina (Brownlee, 2001). A hiperglicemia é também a causa principal de aumento na geração do ânion radical superóxido, sendo o estresse oxidativo aceito como principal fator desencadeante no desenvolvimento das complicações crônicas do DM (Brownlee, 2001).



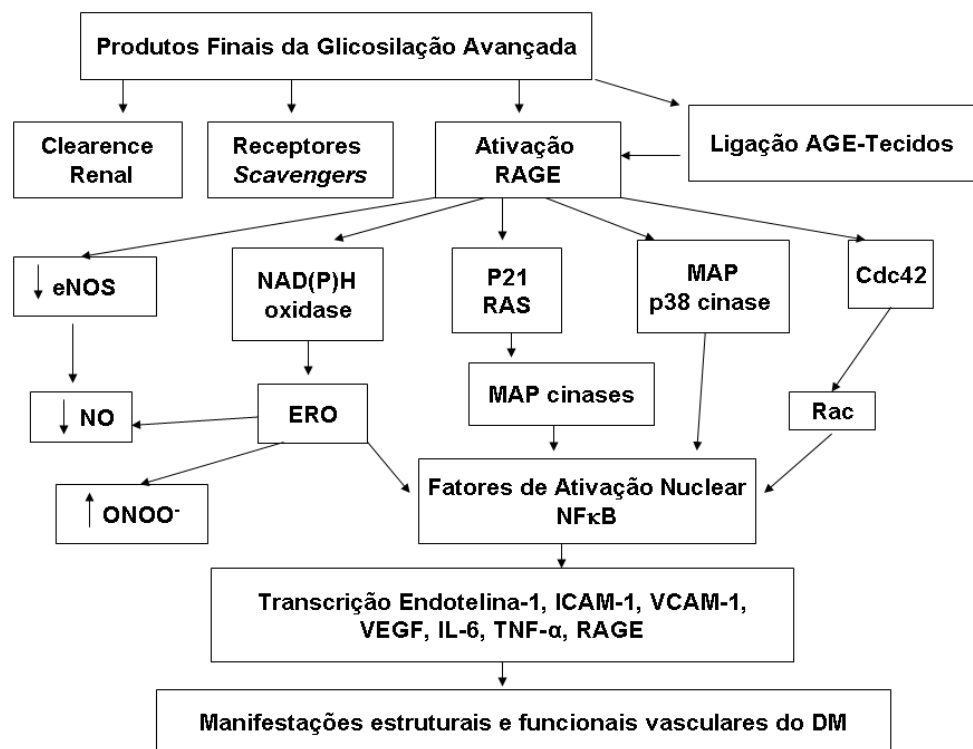
## 1.2- A Via dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada (AGEs)

Apesar de complicações do diabetes mellitus apresentarem origem multifatorial, o processo bioquímico de glicosilação avançada é acelerado devido à hiperglicemia crônica e ao estresse oxidativo. A glicosilação avançada envolve a geração de um grupo heterogêneo de substâncias químicas conhecidas como produtos finais da glicosilação avançada (AGEs). A geração desses produtos resulta de reação não enzimática da glicose com proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Soulis-Liparota, Cooper *et al.*, 1991). A maior parte dos AGEs *in vivo* são formados a partir de níveis elevados de intermediários reativos dos grupos carbonilas conhecidos como  $\alpha$ -dicarbonilas ou oxoaldeídos. Uma das melhores caracterizações químicas dos AGEs em humanos inclui a pentosidina e a N(carboximetil)lisina (CML) (Degenhardt, Thorpe *et al.*, 1998). Os AGEs geralmente se acumulam no meio intracelular e ativam vias de sinalização celular ou modificam a função de proteínas. Seus efeitos - dos AGEs - no diabetes podem ser classificados como independentes ou dependentes de receptores, podendo atuar de maneira intracelular ou através de ligação com a superfície celular por intermédio de receptores, como o receptor para produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) (Goh e Cooper, 2008).

A glicosilação avançada ocorre após período prolongado e afeta proteínas de longa vida. Os componentes estruturais da matriz do tecido conjuntivo e, em particular, os componentes da membrana basal, como o colágeno do tipo IV, são os alvos principais. Outras proteínas de vida longa também são afetadas, incluindo a mielina, a tubulina, o inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e o fibrinogênio (Vlassara, 1996). As proteínas da matriz extracelular são suscetíveis a alterações dos AGEs, devido às suas baixas taxas de renovação (Degenhardt, Thorpe *et al.*, 1998).

A formação de ligações inter e intramoleculares com o colágeno, resultantes do processo de glicosilação, leva a alterações estruturais. Pode ocorrer aumento de rigidez, aumento da resistência à digestão proteolítica,

aumento de proteínas da matriz extracelular (incluindo a fibronectina, colágeno tipo III, IV e VI e laminina) e *up-regulation* de citocinas como o TGF- $\beta$  (Throckmorton, Brogden *et al.*, 1995; Twigg, Cao *et al.*, 2002; Forbes, Cooper *et al.*, 2003).



**Figura 1:** Efeitos dos Produtos Finais da Glicosilação Avançada

Legenda: Cdc42 Ciclo de divisão celular 42, MAP proteína de ativação mitogênica, ERO espécies reativas de oxigênio, ICAM-1 molécula de adesão intercelular-1, VCAM-1 molécula de adesão celular vascular-1, VEGF fator de crescimento do endotélio vascular, IL-6 interleucina-6, TNF- $\alpha$  fator de necrose tumoral- $\alpha$ , ONOO- peroxinitrito, RAGE receptor dos produtos finais de glicosilação avançada, eNOS óxido nítrico sintase endotelial, NADPH nicotinamida adenina dinuceotídeo fosfato reduzida adaptado de Goh e Cooper, 2008).

Os efeitos receptor-dependentes dos AGEs são mediados via interação com diversas proteínas que se demonstram ligantes com essas estruturas complexas. O receptor mais estudado é o RAGE, no entanto, outras proteínas ligantes já foram estudadas. O receptor dos produtos finais de glicosilação avançada (RAGE) é um membro da superfamília das imunoglobulinas da superfície celular. Ao interagir com seu receptor, os AGEs ativam a via de transdução de sinais secundários, como a proteína cinase C (PKC). O alvo chave da sinalização dos AGEs é o NF- $\kappa$ B, que é translocado para o núcleo, ativa a transcrição de numerosas proteínas celulares, incluindo as moléculas de adesão celular-1 (ICAM-1), E-selectina, endotelina-1, fator de crescimento

do endotélio vascular (VEGF) e citocinas pró-inflamatórias (Joral, Boyano *et al.*, 1993; Schiekofer, Andrassy *et al.*, 2003; Goldin, Beckman *et al.*, 2006). A região promotora do receptor contém elementos de ligação funcional para o NF- $\kappa$ B (Hawkins, Barzilai *et al.*, 1997), e uma das consequências de sua translocação é a própria *up-regulation* do RAGE. Esse receptor pode ligar-se a outros peptídeos e proteínas não glicosilados, incluindo a isoforma S100 e a anfoterina, que é um ligante implicado na lesão progressiva vascular. Nas células endoteliais, a interação dos AGE-RAGE pode (levar a) provocar distúrbios na função celular, além de vias envolvendo NAD(P)H oxidase, geradoras de espécies reativas de oxigênio, e proteína cinases de ativação mitogênica (MAPKs) (Schmidt e Stern, 2000).

O RAGE solúvel endógeno (sRAGE) é uma porção variante do receptor completo e é detetável no plasma. O sRAGE não possui o terminal COOH nem domínios transmembrana, pode competir com outros ligantes e prevenir sua interação com a superfície celular do receptor, bloqueando a sinalização celular. O potencial terapêutico do RAGE solúvel foi observado em modelos experimentais de nefropatia e aterosclerose em ratos diabéticos (Schiekofer, Andrassy *et al.*, 2003; Wendt, Harja *et al.*, 2006).

Em pacientes com diabetes do tipo 2, que não apresentam complicações micro ou macrovasculares, os níveis circulantes de sRAGE são significativamente menores do que em sujeitos sem a doença. Além disso, correlacionam-se inversamente com marcadores de estresse oxidativo. Esses achados sugerem que os níveis de sRAGE podem servir como biomarcador e protetor endógeno nas complicações decorrentes ao estresse oxidativo no DM e em outras doenças (Devangelio, Santilli *et al.*, 2007).

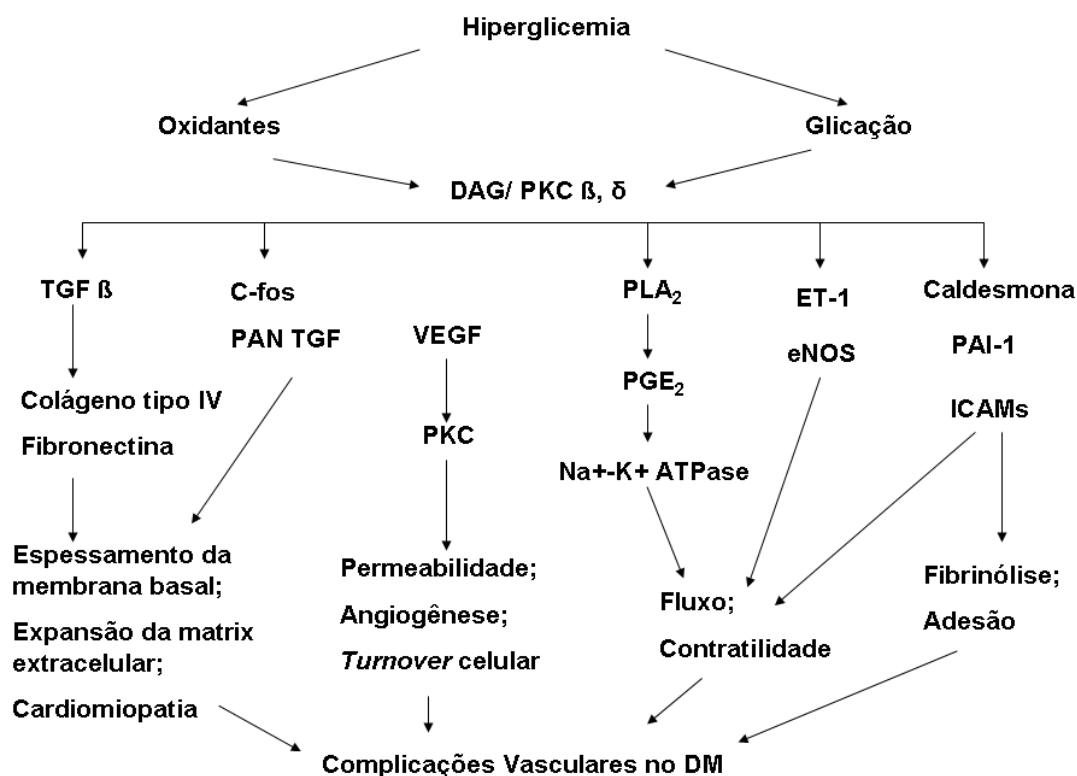
### **1.3- A Via dos Polióis**

A via dos polióis apresenta a enzima aldose redutase como elemento chave em suas reações. A enzima possui baixa afinidade com glicose (alto Km), e concentrações normais de glicose representam baixa atividade desta via. A aldose redutase normalmente tem a função de reduzir aldeídos tóxicos

na célula em alcoóis inativos, porém, quando a concentração de glicose aumenta (como no diabetes), ela também reduz a molécula a sorbitol, que posteriormente é oxidado à frutose. Neste processo, a enzima aldose redutase consome o cofator NADPH, que é essencial no processo de regeneração do antioxidante glutathiona reduzida. Por reduzir a quantidade de antioxidante intracelular, a via dos polióis aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo. Além de o aumento no fluxo desta via contribuir para redução das defesas antioxidantes celulares, outras alterações na homeostase celular são resultantes do acúmulo de sorbitol, incluem o estresse osmótico, pelo fato de sorbitol apresentar baixa difusibilidade e redução na atividade da bomba ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ) ATPase. Estudos experimentais demonstraram redução na disfunção da condução nervosa periférica de cães diabéticos, quando tratados com inibidores da aldose redutase (Engerman, Kern *et al.*, 1994).

#### **1.4- A Ativação da Proteína Cinase C (PKC)**

A hiperglicemia também aumenta a síntese de diacilglicerol (DAG) no meio intracelular, o que contribui na ativação crítica de cofatores para a forma clássica da PKC ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Esse aumento pode resultar da hidrólise de fosfatidilinosídeos, do metabolismo da fosfatidilcolina através da fosfolipase-C ou da síntese *de novo* de DAG, a partir de intermediários glicolíticos. Quando a PKC é ativada pela hiperglicemia ocorre uma variedade de efeitos na expressão de genes (Xia, Inoguchi *et al.*, 1994). Na ativação da PKC, a expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é diminuída, enquanto as expressões da endotelina-1, TGF- $\beta$  e PAI-1 aumentam, representando alterações no fluxo sanguíneo. Outros efeitos fisiológicos e mecanismos celulares da via de ativação DAG-PKC podem ser vistos na Figura 2. O tratamento com um inibidor específico para PKC  $\beta$  reduziu significativamente sua ativação na retina e no glomérulo renal de animais diabéticos, e isso ocasionou melhoras funcionais nessas estruturas (Das Evcimen e King, 2007).



**Figura 2:** Efeitos fisiológicos e vias moleculares envolvidas na ativação DAG-PKC.

Legenda: TGF β- fator de crescimento transformante β, PAN- peptídeo atrial natriurético, VEGF fator de crescimento do endotélio vascular, PLA<sub>2</sub> – fosfolipase A<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> – prostaglandina E<sub>2</sub>, eNOS-óxido nítrico sintase endotelial, PAI-1 inibidor do ativador de plasminogênio-1, ICAMs- moléculas de adesão intercelular. Adaptado de Browlee(2001).

### 1.5- A Via da Hexosamina

O desvio de glicose intracelular excessiva para a via da hexosamina pode também ser a causa de diversas manifestações crônicas no diabetes (Hawkins, Barzilai *et al.*, 1997). A via ocorre durante a fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato, dando seguimento à via glicolítica. No entanto, alguma parte da glicose 6-fosfato diverge em uma via de sinalização na qual a enzima glutamina: frutose 6-fosfato amidotransferase (GFAT) converte a glicose 6-fosfato em glucosamina 6-fosfato e, posteriormente, à uridina difosfato N-acetyl glicosamina (UDP), que é o produto final da via. A N-acetyl glicosamina fosforila os resíduos de serina e treonina de fatores de transcrição, sendo que sua formação em excesso acarreta modificações patológicas da expressão de genes. Essa importante via representa resistência à insulina, induzida tanto

pela hiperglicemia, quanto pela hiperlipidemia. (Marshall, Bacote *et al.*, 1991; Hawkins, Barzilai *et al.*, 1997). O aumento da atividade da GFAT parece estar associado com a resistência à insulina, hiperglicemia pós-prandial e com o estresse oxidativo em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2.

### **1.6-Formação de Espécies Reativas de Oxigênio**

Para que o metabolismo celular ocorra, faz-se necessário o uso de energia derivada da oxidação dos nutrientes, a qual é dirigida para a formação de compostos fosfatados de alta energia, dentre os quais o mais importante é o adenosina trifosfato (ATP). Para a realização de exercícios, a energia é fornecida quimicamente pela hidrólise da molécula de ATP (Maughan *et al.*, 2000). As espécies reativas de oxigênio (ERO) formam-se principalmente durante a redução dessa molécula em água na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Nas membranas mitocondriais, estão situadas as proteínas transportadoras de elétrons, principalmente os citocromos, que reduzem uma molécula de oxigênio em água durante o processo da respiração celular. Essa redução requer quatro sucessivas transferências de um elétron cada uma. A teoria foi proposta por Michaelis (1946) e denominada de redução univalente. Dois dos intermediários das reações são chamados de radicais livres, sendo eles: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ).

A maior parte do oxigênio (aproximadamente 95%) recebe quatro elétrons de uma só vez, pelo sistema oxidativo citocromo-oxidase, redução tetravalente. Porém, em cerca de 5% dos casos, a redução é monovalente, ou seja, a molécula de oxigênio recebe apenas um elétron de cada vez, proporcionando a formação de intermediários reativos e tóxicos denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) (Halliwell & Gutteridge, 1989).

O termo radical livre (RL) é usado quando uma espécie química, que pode ser um átomo como o hidrogênio ou o cloro, um metal de transição ou

uma molécula, possui um elétron não pareado no seu último orbital (Boveris, 1998).

O elétron não pareado neste orbital confere alta reatividade à molécula, a qual apresenta forte tendência a adquirir um segundo elétron para este orbital. Essas espécies altamente reativas têm o potencial de oxidar moléculas biológicas, incluindo proteínas, lipídios e DNA. Quantidades aumentadas de metabólitos oxidados dessas moléculas têm sido detectadas em pacientes com variedade significativa de doenças (Maxwell, 1995).

Quando um RL reage com um composto não radical, outro RL pode ser formado, induzindo, assim, reações em cadeia, como é o caso da lipoperoxidação (LPO). Dessa forma, podem ser produzidos efeitos biológicos distantes do sítio de geração do primeiro RL formado. As reações em cadeia têm uma série de etapas durante as quais se consome uma espécie intermediária, os reativos se convertem em produtos, e os intermediários são regenerados, permitindo que o ciclo recomece. São etapas do processo de LPO : iniciação, propagação e terminação.

A iniciação é o primeiro passo das reações em cadeia, é necessário que o RL ataque uma molécula orgânica, abstraindo um átomo de hidrogênio de um grupamento químico. Na LPO, o RL é geralmente o radical hidroxil, e o grupamento químico é um metileno pertencente a um ácido graxo poliinsaturado da membrana (Meerson, Kagan *et al.*, 1982).

A retirada de um átomo de hidrogênio do grupamento metileno leva à formação de um radical centrado no carbono ( $-\bullet\text{CH}-$ ), o qual tende a se estabilizar por um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado. Este, por sua vez, ao se combinar com o oxigênio, produz o radical peroxil também chamado radical peroxil.

No estágio de propagação, os radicais peroxil são capazes de abstrair hidrogênio de outra molécula lipídica, ou seja, de um ácido graxo adjacente. O radical peroxil pode também se combinar com o átomo de hidrogênio que ele abstraiu, produzindo um lipídio hidroperóxido. Os lipídios hidroperóxidos se decompõem em reação catalisada por complexos de ferro e cobre, produzindo aldeídos como o malondialdeído, hidrocarbonetos voláteis (como o gás pentano) e outros produtos que podem ser detectados experimentalmente (Halliwell & Gutteridge, 1989). Sugeriu-se que as reações de degradação que

ocorrem durante a LPO podem originar oxigênio singlet, acelerando esse processo (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Na etapa de terminação, dois radicais peroxil reagiriam entre si formando um tetróxido instável que se decompõe dando origem ao oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) e carbonilas excitadas, que retornam ao seu estado fundamental emitindo quantas de luz visível.

Além da perda da fluidez da membrana há também desarranjo dos receptores e potenciação da lise celular. O dano dos RL a enzimas que contêm enxofre e outras proteínas culmina em sua inativação, ligações cruzadas e desnaturação (Machlin e Bendich, 1987).

### **1.7- Defesas Antioxidantes**

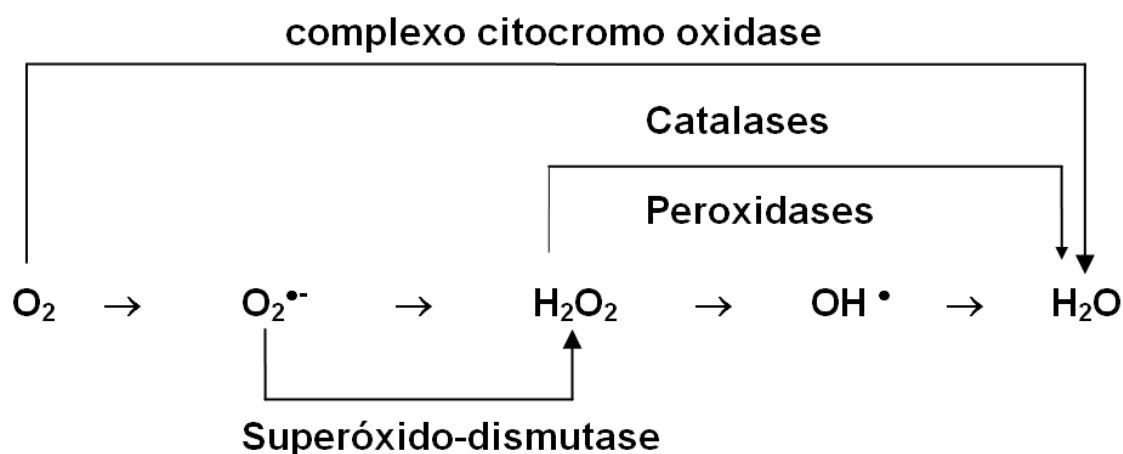
As ERO, quando formadas, ao reagirem com biomoléculas, causam diferentes tipos de danos biológicos que podem levar à morte celular. Os organismos aeróbios desenvolveram diferentes tipos de defesas antioxidantes - enzimáticas e não enzimáticas - prevenindo a formação de ERO, bem como, mecanismos para reparar os danos causados pelos mesmos.

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato - enzimático ou não enzimático (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A defesa do organismo contra as ERO atua na prevenção da formação delas, na interceptação dos radicais formados e no reparo das células danificadas. Os sistemas que previnem a formação de ERO são considerados biomoléculas ligantes de metais (Fe e Cu), os quelantes. A presença de proteínas quelantes é de vital importância aos seres vivos, pois previnem as células dos processos oxidativos catalisados por íons metálicos. Pigmentos especializados previnem a ação da radiação ultravioleta: a melanina e os carotenoides impedem a ação do oxigênio *singlet*. As enzimas que controlam os níveis de ERO são a glutathiona peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). A interceptação é a desativação das ERO, quando



elas são destruídas de forma a impedir a oxidação posterior de outras moléculas. A desativação final de um composto radical consiste na formação de um outro produto não radical. O interceptador (antioxidante) mais eficiente deve combinar propriedades ótimas, as quais reagirão com RL iniciais, tais como radicais peróxil ( $\text{ROO}\bullet$ ) e, posteriormente, interagir com compostos hidrossolúveis para a sua própria regeneração. Estes transferem a função radical para longe do sítio-alvo potencial, são chamados “**scavengers**” de RL. A combinação de uma substância com um RL leva à formação de um não radical ou um radical menos lesivo, como, por exemplo, tocoferóis e carotenóides. Substâncias que funcionam como “**quenchers**” de oxigênio singlet são aquelas que absorvem a energia de excitação e a liberam em forma de calor ou movimento.



**Figura 3:** Mecanismo de defesa enzimática contra as ERO (Del Maestro, 1980).

A mais importante reação envolvendo o superóxido, a qual ocorre espontaneamente, é sua própria dismutação para  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  (Del Maestro, 1980). Entretanto, na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), a dismutação do superóxido pode ser aumentada intracelularmente em  $10^4$  vezes (Southorn e Powis, 1988). Existem várias formas de SOD. Uma, contendo manganês, é encontrada na matriz mitocondrial (Mn-SOD), e outra, contendo cobre e zinco, é encontrada no citosol (CuZn-SOD). Uma superóxido dismutase, contendo ferro, existe em algumas bactérias e plantas. Tem sido

sugerido que os três diferentes tipos da enzima SOD apresentam papel fisiológico diferente.

A enzima CAT decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A maioria das CAT possui um grupo heme ( $\text{Fe}^{+3}$ -protoporfirina) e ligado a cada subunidade uma molécula de NADPH, que auxilia na estabilização da enzima.

A enzima GPx é uma peroxidase que utiliza doadores de  $e^-$  para reduzir o peróxido de hidrogênio em água. A mais importante peroxidase é a glutathione peroxidase que utiliza selênio (Se) no sítio catalítico e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione (GSH -  $\gamma$ -glutamil-cisteil-glicina) como doador de  $e^-$  para a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos, tais como os lipoperóxidos provenientes da LPO, impedindo, assim, a fase de propagação deste processo.

Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de GSH. Em células normais, ocorre a presença de enzimas acessórias. A glutathione reductase (GR) utiliza elétrons do NADPH para a redução de pontes dissulfeto da GSSG e reestabelece os níveis intracelulares de GSH (Deneke e Fanburg, 1989).

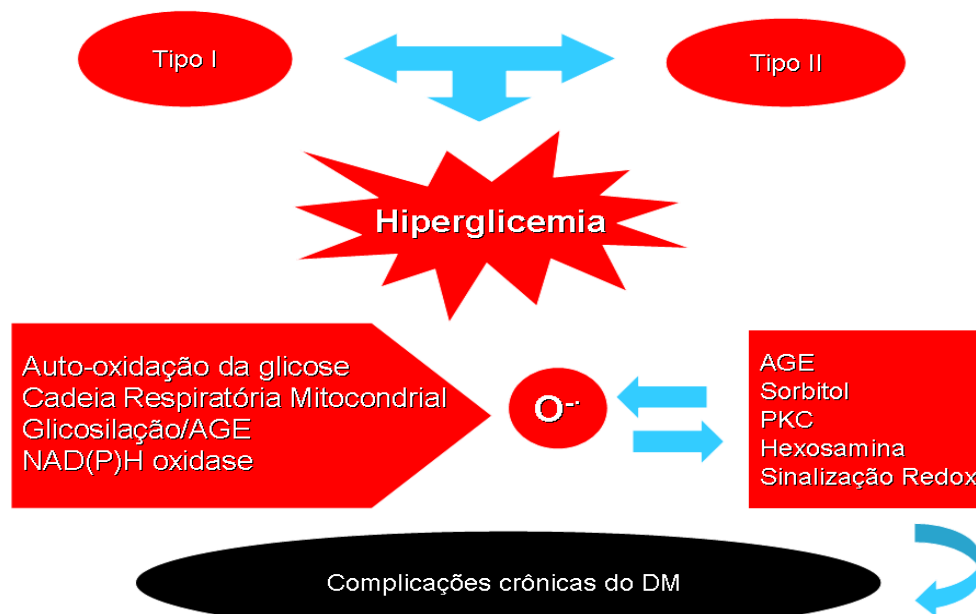
A distribuição das enzimas antioxidantes nas células está intimamente relacionada com as fontes de ERO e elas estão em maior quantidade em locais particularmente expostos as ERO.

## **1.8- Diabetes Mellitus, Estresse Oxidativo e Antioxidantes**

A hiperglicemia também ativa um mecanismo comum às quatro vias patogênicas anteriormente descritas, cujo resultado é o aumento na produção do ânion radical superóxido ( $\text{O}^{\cdot-}$ ) pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. O estresse oxidativo é aceito como fator-chave na mediação do desenvolvimento e progressão do diabetes e de suas complicações (Nishikawa, Edelstein *et al.*, 2000; Bonnefont-Rousselot, 2002; Ceriello, 2003; Evans, Goldfine *et al.*, 2003; Maritim, Sanders *et al.*, 2003). A mitocôndria é a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (ERO) da célula que são

gerados a partir de um pareamento imperfeito no transporte de elétrons (Rolo e Palmeira, 2006). O piruvato derivado da glicólise é transportado para o interior da mitocôndria, onde é oxidado nas reações existentes no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Os elétrons que derivam da oxidação de substratos são transportados por carreadores redox da cadeia respiratória (complexos I, III e IV) para o aceptor final de elétrons, o oxigênio molecular. O oxigênio é convertido em água a partir da redução tetravalente. No entanto, durante o metabolismo normal, formas reativas de oxigênio incompletas são produzidas, como o superóxido. Normalmente, 0,1% do consumo total de oxigênio gera as ERO, e o fator primordial para este desvio é o estado redox da cadeia respiratória (Korshunov, Skulachev *et al.*, 1997). A hiperglicemia induz aumento nos doadores de elétrons (NADH e FADH<sub>2</sub>), aumentando o fluxo de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial. Conseqüentemente, ocorre aumento na relação ATP/ADP e hiperpolarização no potencial de membrana mitocondrial. Essa alta diferença de potencial eletroquímico gerada pelo gradiente de prótons leva à inibição parcial no complexo III do transporte de elétrons, resultando em acúmulo de elétrons na coenzima Q. Isso leva à redução parcial de O<sub>2</sub> e à geração do radical livre superóxido (Korshunov, Skulachev *et al.*, 1997).

O aumento das espécies reativas de oxigênio pode ser prevenido por um inibidor do complexo II da cadeia de transporte de elétrons e pela enzima manganês superóxido dismutase (Nishikawa, Edelstein *et al.*, 2000). A normalização dos níveis de espécies reativas de oxigênio pela ação desses dois agentes previne a ativação induzida pela glicose da PKC, a formação de AGEs, o acúmulo de sorbitol e a ativação de NFκB em células endoteliais aórticas bovinas expostas à hiperglicemia (Nishikawa, Edelstein *et al.*, 2000).



**Figura 4:** Principais vias que levam as complicações crônicas do DM. Independente do tipo do DM, a hiperglicemia é a principal via patogênica. As principais vias de aumento na geração do ânion radical superóxido estão relacionadas com as vias que levam as complicações crônicas do DM. AGE: Produtos Finais de Glicosilação Avançada, PKC: Proteína cinase C.

A utilização de antioxidantes exógenos pode ser uma alternativa na terapêutica do diabetes mellitus. Estudos experimentais demonstram resultados favoráveis de melhora na atividade de enzimas antioxidantes e na redução do estresse oxidativo após a utilização de antioxidantes (Dias, Porawski *et al.*, 2005; Hurdag, Uyaner *et al.*, 2008; Sadi, Yilmaz *et al.*, 2008). Em recente trabalho de nosso grupo de pesquisa, foi avaliado o potencial antioxidante do extrato aquoso de *Agaricus blazei* Murril, também conhecido como “cogumelo do sol”. O estudo avaliou o potencial *in vitro* do extrato e também a utilização como tratamento em modelo crônico de DM induzido por estreptozotocina. O estudo demonstrou que o *Agaricus blazei*, por apresentar efeito antioxidante, reduz o dano tecidual pulmonar dos ratos diabéticos (Anexo 1). Apesar de diversos estudos demonstrarem a eficiência da utilização de antioxidantes no DM experimental, a utilização da vitamina E, como antioxidante, apresentou limitações em um ensaio clínico. Segundo o estudo, a vitamina E e outros antioxidantes que atuam como *scavengers* de espécies reativas já formadas podem ser efetivos para tratamentos dos sintomas e não das causas. (Cuzzocrea, Riley *et al.*, 2001; Marchioli, Schweiger *et al.*, 2001). Componentes moleculares que mimetizam as ações das enzimas antioxidantes

superóxido dismutase (SOD) ou catalase, teoricamente, possuem maior ação catalítica e eficiência semelhante às enzimas endógenas. (Nassar, Kadery *et al.*, 2002).

### 1.9- Superóxido Dismutase (SOD) e utilização clínica da Orgoteína

O estresse oxidativo induzido pelo ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) está envolvido na patogênese de diversas doenças, incluindo o DM. Conseqüentemente, estratégias para reduzir o  $O_2^{\cdot-}$  apresentam relevância no tratamento de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Fattman, Schaefer *et al.*, 2003). Nos anos 60, Fridovich investigou a redução dependente do oxigênio do citocromo c pela xantina oxidase. Nesse processo, foi descoberta nos eritrócitos uma proteína capaz de inibir a redução do citocromo c. Essa proteína, em um primeiro momento, foi purificada como uma proteína ligante com o cobre e, posteriormente, foi descoberta sua ação de *scavenger* do radical superóxido. (Fridovich, 1970; Klug, Rabani *et al.*, 1972).

A ação de *scavengers* do  $O_2^{\cdot-}$  é realizada por um grupo de enzimas antioxidantes denominadas superóxido dismutases (SODs), que catalisam a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  até  $H_2O_2$  e  $O_2$  de maneira eficiente e específica. Tecidos de mamíferos possuem três isoformas de SODs: Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1), Mn SOD (SOD2) e SOD extracelular (SODec ou SOD3). A SOD1 é proteína celular homodímera de 32 kDA que contém de forma abundante cobre e zinco, estando presente no citosol, núcleo, peroxissomos e na membrana mitocondrial. A sua função primária é reduzir a concentração intracelular estacionária de  $O_2^{\cdot-}$ . SOD2 é uma enzima mitocondrial que atua na diminuição do superóxido gerado pela atividade da cadeia respiratória mitocondrial. A SODec atua de maneira importante na regulação da pressão arterial e no tônus vasomotor, através da modulação da função endotelial, controlando os níveis de  $O_2^{\cdot-}$  extracelular e a bioatividade do NO (Landis e Tower, 2005).

Ao mesmo tempo em que McCord e Fridovich purificaram a SOD, outro grupo de pesquisadores purificou um composto anti-inflamatório idêntico à SOD, a orgoteína (Huber, 1981). Orgoteína é o nome genérico adaptado pelo

*USAN Council (U.S. Adopted Names Council)* para a Cu/Zn superóxido dismutase. Essa droga é obtida a partir do fígado bovino por um processo que envolve em forma sequencial tratamento térmico, digestão enzimática de outras proteínas e purificação do homogeneizado através da cromatografia de troca iônica (Borrelli, Serafini *et al.*, 1979). A SOD é encontrada naturalmente em todas as células de mamíferos, e o fígado, rim e eritrócitos representam as maiores fontes endógenas. Anteriormente à utilização da orgoteína na prática clínica, uma variedade de investigações toxicológicas e patológicas em animais foi conduzida. Tais estudos indicaram que a orgoteína apresenta potente atividade anti-inflamatória e efeitos farmacológicos diversos, apresentando baixa toxicidade (Carson, Vogin *et al.*, 1973; Huber, 1981). Nos anos 80, aproximadamente seis milhões de doses da orgoteína foram administradas em pacientes na Europa, e diversos estudos clínicos demonstram os efeitos da utilização da orgoteína em doenças inflamatórias. Dentre os estudos, destacam-se a utilização e o efeito da orgoteína nas complicações secundárias agudas da radioterapia e da radiação intensa na cabeça, no pescoço (Valencia, Velilla *et al.*, 2002) e na pelve (Esco, Valencia *et al.*, 2004), na doença de Peyronie (Marberger, Bartsch *et al.*, 1975; Gustafson, Johansson *et al.*, 1981; Ianev e Tsvetkov, 1989), nas artrites (Biehl, 1981; Puhl, Biehl *et al.*, 1981; Goebel e Storck, 1983; Amato, Calcagno *et al.*, 1986), na contratura de bexiga (Stroker e Schlutz, 1986; Villani, Leoni *et al.*, 1986), na esclerose múltipla (Lund-Olesen, 1985) e nas cicatrizes hipertróficas e queloides (Grosser, Stark *et al.*, 1984).

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo Geral**

Tendo em vista o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese das complicações diabéticas e o potencial terapêutico da orgoteína, o presente estudo tem como objetivo investigar os efeitos da utilização exógena do antioxidante orgoteína (ORG) sobre o estresse oxidativo, a ativação do fator de ativação nuclear kappa B (NFκB) e a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática no modelo experimental de diabetes *mellitus*.

### **2.2- Objetivos Específicos**

- 1) Determinar o peso corporal e a glicose sanguínea dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados.
- 2) Avaliar a lipoperoxidação mediante a determinação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado.
- 3) Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) no tecido hepático.
- 4) Avaliar os metabólitos do Óxido Nítrico (nitritos e nitratos) no tecido hepático nos diferentes grupos.
- 5) Determinar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática nos diferentes grupos estudados.
- 6) Determinar a expressão nuclear da p65 no fígado dos diferentes grupos estudados.

### **3- MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1- Animais e protocolo experimental**

O protocolo experimental utilizado estava de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS). Foram utilizados ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O peso médio dos animais, no início do estudo, era de 200 a 300 gramas (g). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $22\pm 4^{\circ}$  C em ciclo de doze horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas).

O DM foi induzido por única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina - STZ (Sigma *Chemical Company*, St. Louis, MO, EUA) na dose de 70 mg/Kg de peso corporal (Like e Rossini, 1976). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e ácido cítrico (0,1M, pH 4,5), sendo administrada na região abdominal esquerda do animal cerca de dez minutos após a diluição em solução tampão. Os animais do grupo controle receberam somente NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume do tampão utilizado para dissolver a STZ.

Foram utilizados 28 ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos: controles (CO), controles tratados com orgoteína (CO+ORG), diabéticos (DM) e diabéticos tratados com orgoteína (DM+ORG). A superóxido dismutase (Ontosein<sup>®</sup> - orgoteína-, Lab. Tedeia-Meiji Farma, S. A., Madrid- Espanha) foi



utilizada na dose de 13 mg/Kg de peso corporal durante os últimos sete dias de experimento, administrada subcutaneamente. No 60º dia, os animais foram sacrificados, e o fígado retirado para posteriores análises.

Depois do período de sessenta dias de DM, os animais, após anestesia profunda com cloridrato de Cetamina (Ketalar®) e cloridrato de Xilasina (2,6-xilidina) – 5-6 dihidro-4h-1,3 tiazina (Rompum®), numa proporção de 100mg/kg de Cetamina para 50mg/kg de Xilasina. Os anestésicos foram administrados intraperitonealmente na região abdominal esquerda. A profundidade da anestesia foi controlada pelos reflexos plantares e oculopalpebrais e os animais foram mortos por exsanguinação. O sangue foi retirado do seio retro-orbital, foi centrifugado durante quinze minutos, para dosagem da glicemia sanguínea, e o fígado foi retirado, pesado, colocado em porções e congelado a -80°C para posteriores dosagens.

### **3.2- Análises Bioquímicas e Preparo do Homogeneizado**

#### **3.2.1- Avaliação da glicemia**

Para determinação da glicemia, foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica), no qual um reagente foi misturado a 20 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E – UV- Visible Spectrophotometer Varian) com comprimento de onda de 500 nm. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentaram a concentração de glicose sanguínea acima de 250 mg/dL.

#### **3.2.2- Preparo dos homogeneizados de fígado**

Colocaram-se 9 mL de tampão fosfato (KCL 140 mM, fosfato 20 mM pH 7,4) por grama de tecido. Foi utilizado o PMSF, um inibidor de proteases, para

que não houvesse degradação das enzimas posteriormente medidas. O órgão foi homogeneizado em Ultra-Turrax (*IKA-WERK*) durante quarenta segundos, à temperatura de 0 a 2° C. Esse homogeneizado foi centrifugado refrigeradamente (*SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge*) durante dez minutos, a 3000 rpm (1.110 x g). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado, congelado em freezer em temperatura de -80° C para ser usado para as dosagens.

### **3.2.3- Obtenção da Fração Citosólica**

Foi homogeneizado um grama de fígado em 4 mL de tampão fosfato sódico (0,2 M, pH 6,5) e centrifugado a 100.000 x g durante sessenta minutos a 4°C. A fração citosólica coletada foi o sobrenadante (Llesuy *et. al.*, 1985)

### **3.2.4- Obtenção da Fração Mitocondrial**

Ressuspendeu-se o precipitado obtido na centrifugação anterior (12.000 x g durante dez minutos a 4°C) em 4 mL de tampão manitol 0,25 M, sacarose 70 mM e Hepes 3 mM, pH 7,4. Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 x g durante dez minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi ressuspenso em 1,5 mL de tampão sacarose 0,25 M, EDTA 2 mM e pH 7,4.

### **3.2.5- Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas dos homogeneizados de fígado foi determinada utilizando, como padrão, uma solução de albumina bovina 1

mg/mL (utilizaram-se os volumes de 50, 100 e 150  $\mu$ L). Foi colocada uma alíquota do homogeneizado (20 $\mu$ L) em 780  $\mu$ L de água destilada e 2,0 mL do reativo C que foi preparado com 50 mL de NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mL do reativo B<sub>1</sub> (CuSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5 mL do reativo B<sub>2</sub> (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do reativo C, foram aguardados dez minutos e colocou-se 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído na proporção 1:3 em água destilada. Após trinta minutos, a solução apresentou coloração azulada, que pôde ser medida em espectrofotômetro a 625 nm (Lowry, Rosebrough *et al.*, 1951).

### **3.3- Determinação do Estresse Oxidativo**

#### **3.3.1- Medida das Substâncias que Reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

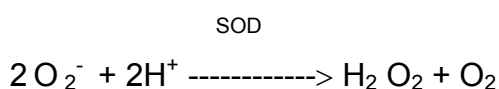
A técnica de TBA-RS consiste no aquecimento do homogeneizado com o ácido tiobarbitúrico e na conseqüente formação de um produto corado, medido em espectrofotômetro a 535 nm. O aparecimento de coloração ocorre devido à presença do malondealdeído e outras substâncias provenientes da peroxidação lipídica no material biológico.

As amostras de tecido foram colocadas em tubo de ensaio, nesta ordem de adição, 0,75 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%, 0,25 mL do homogeneizado, 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e 25 mL de água destilada. O TBA reagiu com produtos da lipoperoxidação formando uma base de Schiff, e o TCA teve a função de desnaturar as proteínas presentes, além de acidificar o meio da reação. Posteriormente, agitou-se cada tubo e fez-se a incubação em 100 ° C durante quinze minutos, os tubos foram resfriados e acrescentado 1,5 mL de álcool n-butílico para extrair o pigmento formado. Eles, então, foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos e centrifugados por dez minutos a 3000 rpm (1110 x g). Por último, o produto corado foi retirado e lido em espectrofotômetro (*CARY 3E - UV - Visible Spectrophotometer Varian*) com comprimento de onda de 535 nm. A

concentração de TBARS obtida foi expressa em nmol por mg de proteína (Buege e Aust, 1978).

### 3.3.2- Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Essa técnica para a determinação da SOD, segundo MIRSA e FRIDOVICH (1972), está baseada na inibição por superóxido dismutase da formação de adrenocromo na autoxidação da epinefrina.



Considerando que a epinefrina permanece estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação de adrenocromo, a SOD pôde ser medida espectrofotometricamente seguindo a troca de absorbância de epinefrina a 480nm, quando apresentou um pico de absorbância.

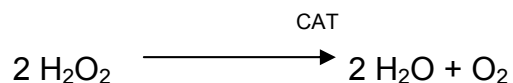
Para a reação ocorrer, foi preparada uma mistura com volume final de 1 mL com tampão bicarbonato (0,05 M; pH 10,2), fração citosólica e epinefrina (4 mM). A absorbância utilizada foi de 480 nm, a 30°C.

A reta padrão foi elaborada com concentrações crescentes de SOD (20 a 100 nM) para determinar em que grau de concentração produz-se a inibição da autoxidação da epinefrina em 50%. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma atividade enzimática define-se como a quantidade de enzima que é capaz de inibir 50% da autoxidação da epinefrina (Misra e Fridovich, 1972).

### 3.3.3- Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pelo método descrito por Chance em 1954 (AEBI,1984). A catalase é uma hemoproteína peroxissomal

que realiza a catálise do peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular.



A velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é medida espectrofotometricamente a 240 nm, e neste comprimento de onda, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  tem a máxima absorvância.

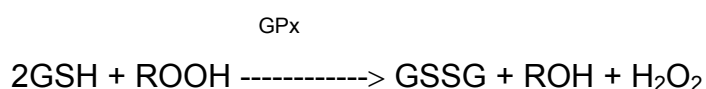
Processo de Realização: a mistura de incubação continha um volume final de 1000 $\mu\text{L}$  com os seguintes reagentes:

- tampão fosfato 50mM, pH 7,4
- $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3M

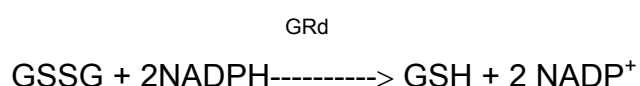
Na cubeta de quartzo, foram adicionados 955 $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 25 $\mu\text{L}$  de amostra do tecido hepático, os quais foram colocados no aparelho, descontando-se o branco. Foram adicionados 20 $\mu\text{L}$  do peróxido de hidrogênio e realizaram-se leituras em 240nm. Os resultados foram expressos em pmoles/g de tecido(Aebi, 1984).

### 3.3.4- Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPx)

A determinação da glutathiona peroxidase selênio dependente, mediante o método de GUNTZLER e FLOHE (1985), consiste na medida de oxidação de NADPH por glutathiona redutase, sendo que a oxidação registra-se espectrofotometricamente a 340 nm.



A atividade da GPx pode ser estudada, medindo-se a velocidade de consumo de NADPH em um sistema que contenha GSH.



A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente, medindo-se a velocidade de oxidação do NADPH em uma reação. Em uma cubeta de quartzo, foram colocados 330  $\mu\text{L}$  de solução reguladora de fosfatos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (100 mM, pH 7,0) com 500  $\mu\text{L}$  de NADPH (10mM), 50  $\mu\text{L}$  de TBOOH (10mM) e 10  $\mu\text{L}$  de glutathione redutase (12 U/mL). A mistura foi lida durante um minuto, fez-se uma linha de base e, em seguida, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de GSH (100mM) e 50  $\mu\text{L}$  de homogêneo. As amostras foram incubadas a 25°C durante cinco minutos, e lidas em uma absorbância de 340 nm. A atividade foi expressa em nmol/min/MG de proteína.

### 3.3.5- Medida de Nitritos e Nitratos

Inúmeras células em diferentes tecidos do corpo humano podem produzir óxido nítrico (NO), sendo que, na ausência de estimulação imunológica, a maior parte do NO é produzida pelas células endoteliais e do sistema nervoso central. O óxido nítrico é uma substância extremamente lábil com meia-vida de apenas alguns segundos em sistemas biológicos. Assim sendo, a atividade “in vivo” do NO deve ser monitorizada indiretamente, pois o óxido nítrico rapidamente se oxida em nitritos e, predominantemente, em nitratos.

Inicialmente devemos converter todos os nitratos em nitritos, utilizando a enzima *Aspergillus Nitrate Reductase*. A seguir, é feita a medida dos nitritos totais através do método de Griess (Schmidt, Wilke *et al.*, 1989).

As amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos (Tris 1 mol/L, pH 7,5; NADPH 0,02 mmol/L), glicose 6-fosfato, (G6P) 5 mmol/L, glicose 6-P desidrogenase (G6PDH) 10 U/ml e nitrate redutase, (1,75 U/ml; Sigma, St. Louis, MO) durante uma hora, para conversão de nitrate em nitrite em temperatura ambiente. Os nitritos foram determinados pela reação das amostras com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% naftiletilediamina 2,3 mL ácido ortofosfórico 85%). O total de nitrite tecidual (nitrite inicial mais o nitrite produzido a partir de redução de nitrate) foi estimado

em 540 nm, a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $10^{-8}$  a  $10^{-3}$  mol/L). Os resultados foram expressos em mmol/L

### 3.4- Western blot

A técnica utilizada foi a de Western Blot, sendo realizada através do sistema descrito por Laemmli em 1970. Em primeiro lugar, foi realizado um homogeneizado com 1g de tecido em 5mL de tampão de lise ( NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, tris 20 mM, pH8,0), ao qual foi adicionada uma mistura de inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e inibidor de tripsina). O homogeneizado foi incubado durante trinta minutos, a 4°C, sendo centrifugado durante trinta minutos, a 13.000 xg e 4°C, retirando-se o sobrenadante em alíquotas (Laemmli, 1970).

Posteriormente, foi selecionada uma quantidade de amostra equivalente a 50 µg de proteína, à qual se adicionou a solução (H<sub>2</sub>O, tris/HCl 0,5 M, DTT 1% e azul de bromofenol) e o marcador de peso molecular (Perfect Protein™ Western Markers, Merck), sendo incubada, durante cinco minutos, a 100°C. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida a 9-12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH8,8).

Após separadas, as proteínas foram transferidas para gel de nitrocelulose, a fim de permitir sua exposição aos anticorpos. Uma vez extraído o gel, este foi equilibrado em um tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2 M e metanol 20%). O procedimento foi realizado em 13 volts (V), durante 25 minutos. A fim de verificar o procedimento, introduziu-se na membrana de nitrocelulose uma solução de vermelho Ponceau para visualizar as proteínas totais. A membrana foi lavada com agitação, durante cinco minutos, com água, e durante outros cinco minutos, com PBS (0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl). Depois disso, foi colocada durante trinta minutos em solução de bloqueio (4% de leite em pó desnatado em PBS-Tween frio) a 37°C.

A membrana foi incubada durante uma noite em anticorpos específicos (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA e Cell Signaling Technology, MA) para as proteínas, a diluição utilizada para cada anticorpo foi iNOS : 1/300 e

p65: 1/1000 em leite a 4%. Após esse período, ela foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Para controle de carga foi utilizada marcação com anticorpo anti- $\beta$ -actina ( $\beta$ -Actin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Posteriormente, foi incubada durante uma hora e meia com anticorpo anti-imunoglobulina de coelho, unido à HRP (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido esse tempo, a membrana foi lavada cinco vezes em PBS-Tween.

A detecção das proteínas foi realizada por quimiluminescência, utilizando um Kit comercial ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Grã-Bretanha), expondo a membrana durante um minuto a esta mistura comercial. Posteriormente, foi introduzida uma fita cassete junto com o filme de revelação (Amersham Hyperfilm ECL, UK) durante, aproximadamente, dois minutos.

Após a lavagem do filme, as bandas foram quantificadas por densitometria, utilizando o programa Scion Image 4.02 para Windows (Scion Corporation, Frederick, USA). Os resultados foram expressos em relação à percentagem do controle (100%).

### **3.5- Análise Estatística**

Os dados foram representados através de média  $\pm$  desvio padrão (DP) e analisados por meio do software estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* versão 15.0 (SPSS 15.0). As variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste de *One-way analysis of variance* (ANOVA) foi utilizado para diferenças intergrupos. Para as variáveis paramétricas, foi utilizado o pós-teste de *Bonferroni* e, para as não paramétricas, o teste *Kruskal-Wallis*. Para correlação entre variáveis, foi utilizado o teste de Pearson. Foi considerado o nível de significância de  $p < 0,05$ .



## 4- RESULTADOS

### 4.1- Peso Corporal e Glicemia

A administração da orgoteína não reduziu a glicemia dos ratos diabéticos. Houve redução significativa no peso dos animais do grupo diabético (DM), e o tratamento com ORG (DM+ORG) não reverteu esta condição (tabela 1).

**Tabela 1: Peso corporal e concentração da glicose sanguínea nos diferentes grupos estudados.**

<b>Variáveis/ grupos</b>	<b>CO</b>	<b>CO+ORG</b>	<b>DM</b>	<b>DM+ORG</b>
Peso (g)	332,8±27,66	312±25,45	299,33±46,17*	266,28±28,23*
Glicemia (mg/dL)	237,95±54,27	217,23±27,45	481,29±84,15*	397,43±29,15*

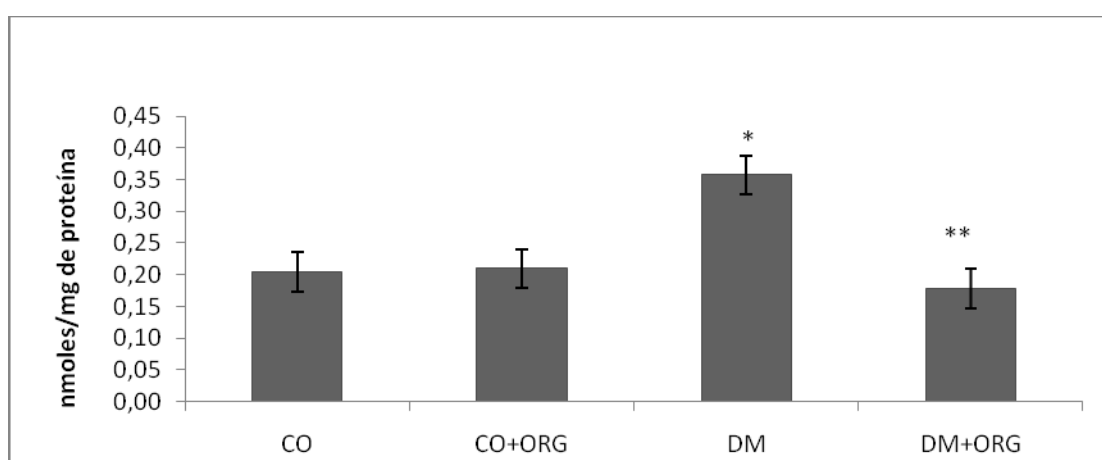
Dados representados como média±desvio padrão (DP).

CO= Controle, ORG= orgoteína DM=Diabetes *Mellitus*.

\*diferença significativa em relação ao grupo controle (p<0,05)

## 4.2- Determinação do Estresse Oxidativo

O marcador de lipoperoxidação (TBARS), avaliado neste estudo, apresentou alterações significativas, principalmente entre o grupo diabético e o controle, e daquele com o que recebeu tratamento com a orgoteína. O grupo DM apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na lipoperoxidação hepática, e o tratamento com a orgoteína reduziu significativamente ( $p < 0,01$ ) esses valores (Figura 5).

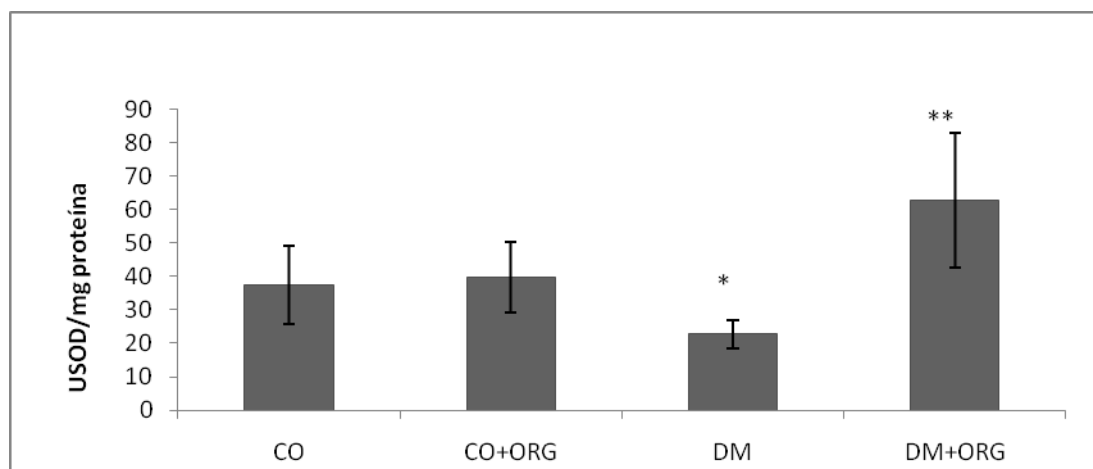


**Figura 5:** Medidas das Substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP). Diferença significativa entre o grupo controle e o diabético \*( $p < 0,05$ ). Diferença significativa entre o grupo diabético e o diabético que recebeu ORG (\*\*( $p < 0,01$ )).

## 4.3- Atividades das Enzimas Antioxidantes

Podemos observar, na **Figura 6**, a apresentação dos valores referentes à atividade citosólica da enzima SOD. A SOD apresentou redução no grupo DM ( $p < 0,05$ ) e aumento no grupo DM+ORG ( $p < 0,001$ ). Na **Figura 7**, verificamos a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT). A CAT estava aumentada no grupo DM ( $p < 0,01$ ), e o tratamento com a orgoteína restabeleceu valores de atividade semelhantes ao grupo controle (CO). Na **Figura 8**, verificamos que a atividade citosólica da enzima antioxidantes GPx

reduziu no grupo DM ( $p < 0,01$ ), e o grupo DM+ORG apresentou aumento da atividade enzimática ( $p < 0,05$ ).

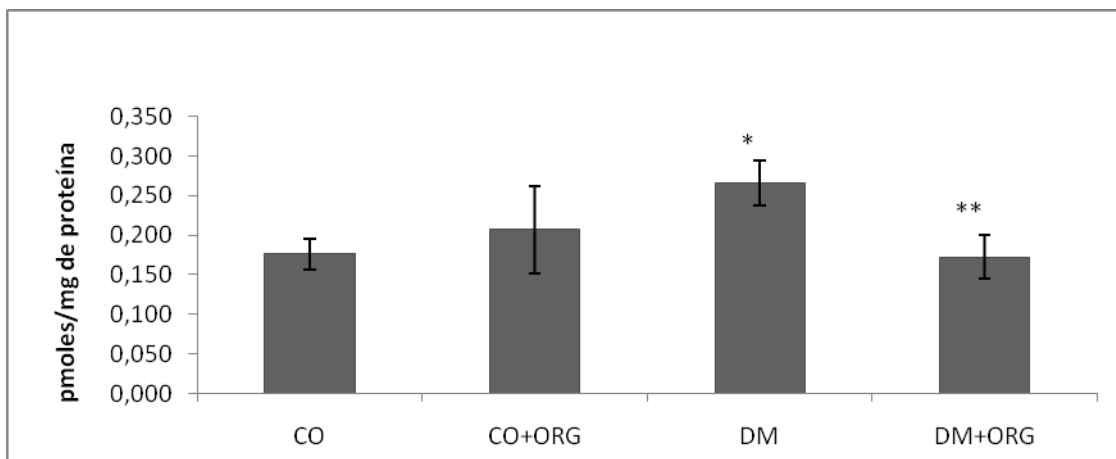


**Figura 6:** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

Diferença significativa entre o grupo controle e o diabético \* ( $p < 0,05$ ).

Diferença significativa entre o grupo diabético e o diabético que recebeu orgoteína exógena ( $p < 0,001$ ), e deste com o controle \*\* ( $p < 0,05$ ).

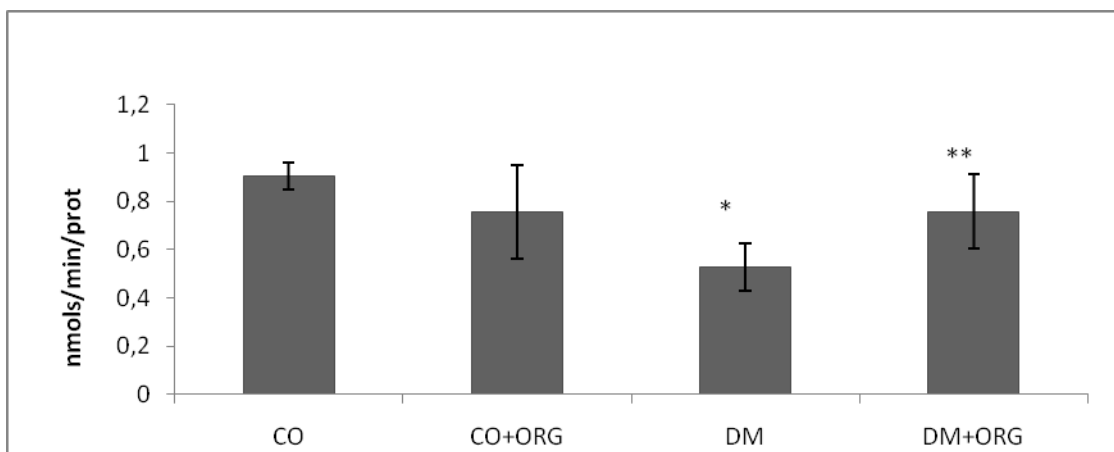


**Figura 7:** Atividade da enzima catalase (CAT).

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

Diferença significativa entre o grupo controle e o diabético \* ( $p < 0,01$ ).

Diferença significativa entre o grupo diabético e o diabético que recebeu orgoteína \*\* ( $p < 0,001$ ).



**Figura 8:** Atividade da enzima glutathione peroxidase (Gpx).

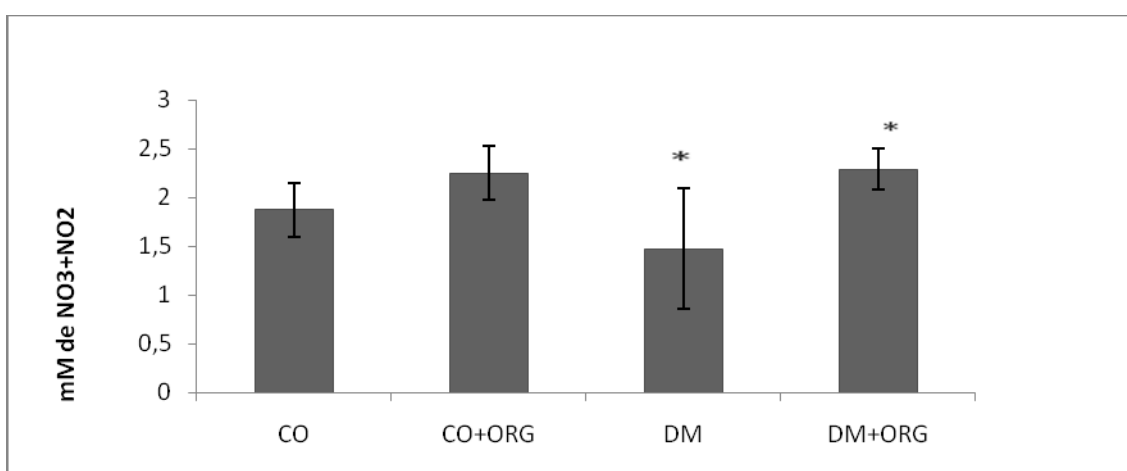
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

Diferença significativa entre o grupo controle e o diabético ( $p < 0,01$ ).

Diferença significativa entre o grupo diabético e o diabético que recebeu orgoteína ( $p < 0,05$ ).

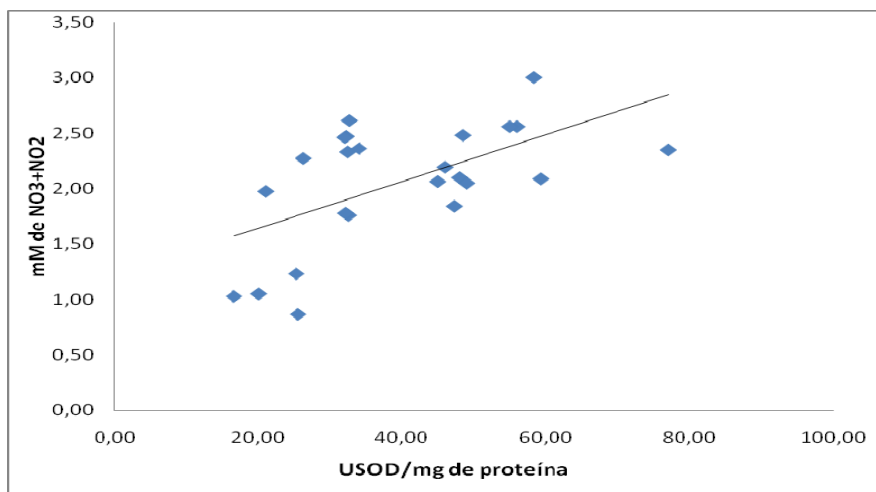
#### 4.4 - Medida dos Nitritos e Nitratos

A medida dos nitritos e nitratos apresentou redução no grupo diabético e aumento após o tratamento com a orgoteína (**Figura 9**). Foi observada correlação positiva entre a atividade da SOD e os níveis de nitritos e nitratos ( $p = 0,023$ ;  $r = 0,565$ ).



**Figura 9:** Efeito da orgoteína sobre os nitritos e nitratos totais no diabetes *mellitus* experimental.

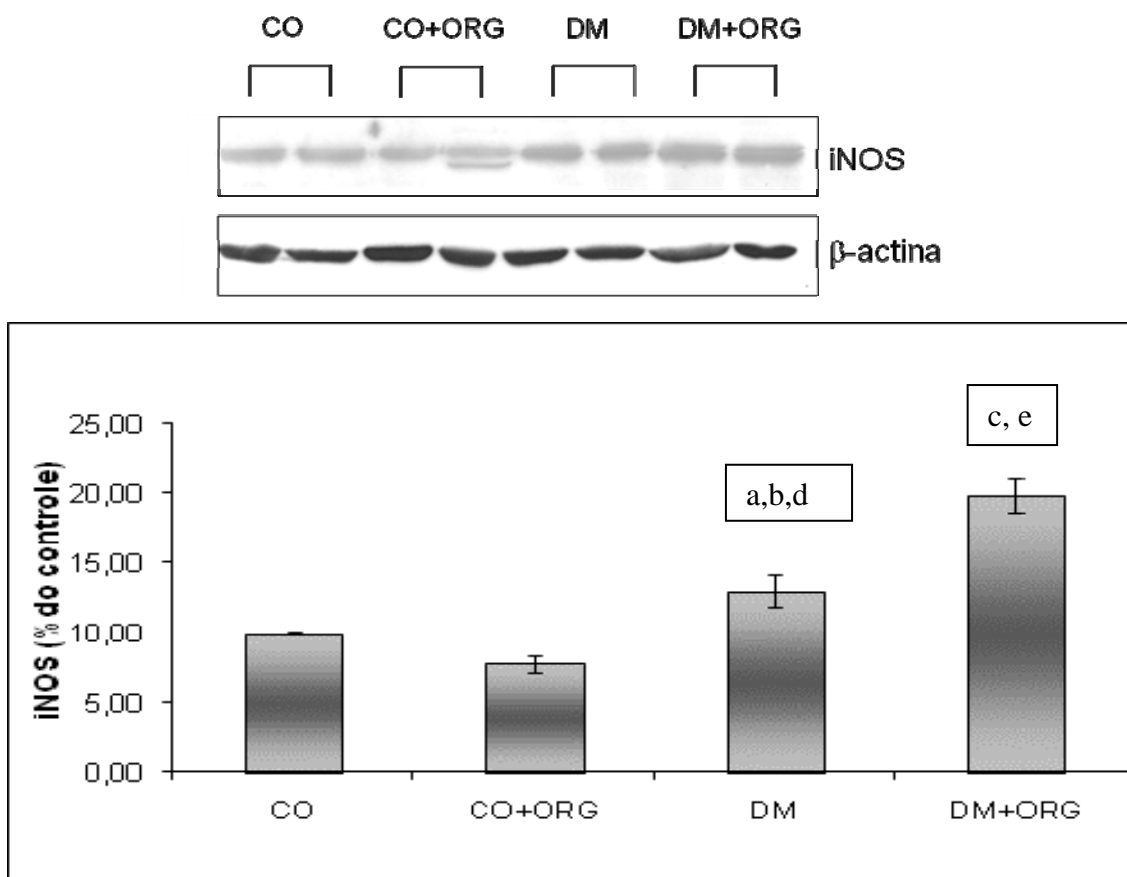
$p < 0,05$  COvsDM;  $p < 0,05$  DMvsDM+ORG



**Figura 10:** Correlação entre a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase e a medida de nitritos e nitratos totais no DM experimental.  
 $p=0,023$ ;  $r=0,565$

#### 4.5- Expressão da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS)

A expressão da iNOS apresentou aumento do grupo DM em relação ao CO, e o grupo tratado com orgoteína apresentou aumento, quando comparado ao próprio grupo DM (**Figura 11**).



**Figura 11:** Efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina e da orgoteína na análise de Western blot da proteína iNOS no fígado. As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida-SDS a 12% e incubadas com anticorpo anti-iNOS.

a- COvsDM  $p < 0,05$ ;

b- DMvsDM+ORG  $p < 0,01$ ;

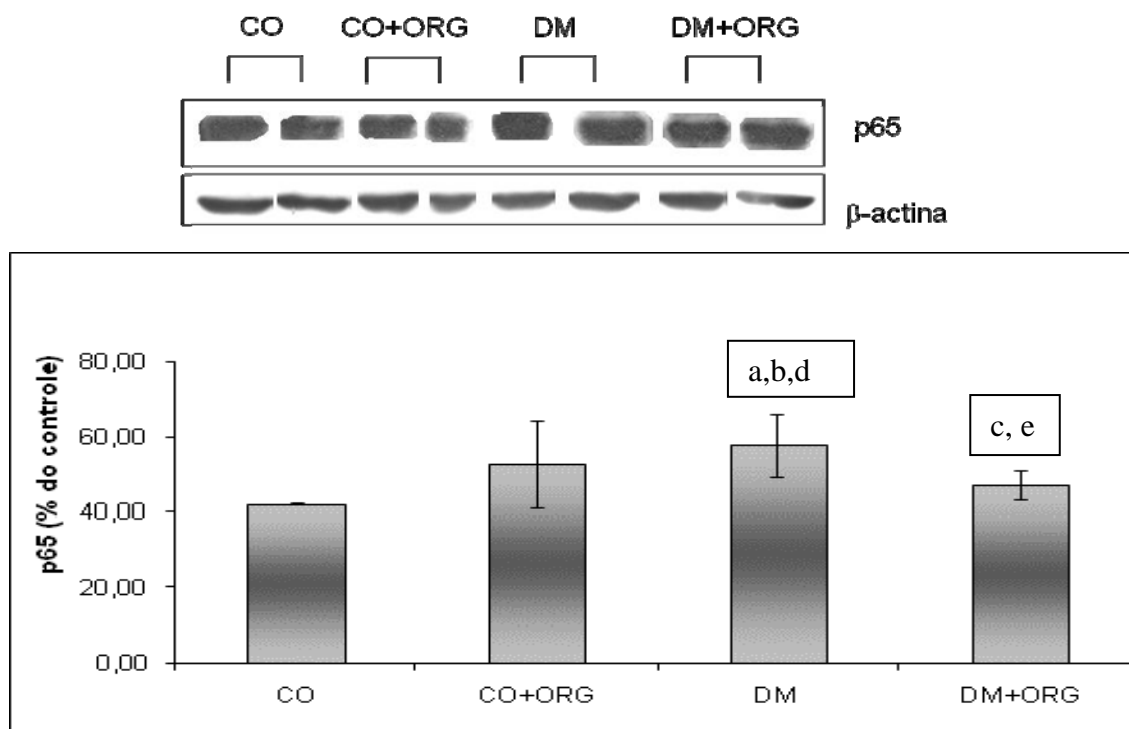
c- CO+ORGvsDM+ORG  $p < 0,001$ ;

d- CO+ORGvsDM  $p < 0,01$ ;

e- CO+ORGvsDM+ORG  $p < 0,001$

#### 4.6- Expressão da p65 do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB)

A p65 estava mais expressa no DM ( $p < 0,05$ ) e sem diferença estatística quando comparados os grupos diabéticos e diabéticos tratados (**Figura 12**).



**Figura 12:** Efeito do diabetes induzido pela estreptozotocina e da orgoteína na análise de Western blot da proteína p65 no fígado.

A proteína da fração nuclear foi separada em um gel de poliacrilamida-SDS, a 12%, e incubada com anticorpo anti-p65.

- a- COvsDM  $p < 0,05$ ;
- b- DMvsDM+ORG  $p > 0,05$ ;
- c- CO+ORGvsDM+ORG  $p > 0,05$ ;
- d- CO+ORGvsDM  $p > 0,05$ ;
- e- CO+ORGvsDM+ORG  $p > 0,05$ .

## 5- DISCUSSÃO

Os resultados da presente pesquisa confirmam estudos anteriores que descreveram o aumento do estresse oxidativo hepático no modelo de diabetes mellitus experimental. Tais estudos demonstraram alterações na atividade das enzimas antioxidantes associadas ao dano oxidativo hepático (Stadler, Jenei *et al.*, 2003; Dias, Porawski *et al.*, 2005; Sadi, Yilmaz *et al.*, 2008). O fígado é órgão de essencial importância, rico em mitocôndrias devido suas funções metabólicas e, em um estado hiperglicêmico crônico, o dano oxidativo hepático é considerado um processo relevante (Ren, Li *et al.*, 2008).

A orgoteína não apresentou efeito em relação aos valores de glicemia dos animais diabéticos. A utilização de miméticos da SOD em estudos anteriores não demonstrou efeitos de redução na glicemia, apesar de outros efeitos benéficos sobre o balanço redox (Peixoto, Pessoa *et al.*, 2009). Isso coincide com os resultados que reportam os benefícios de outros antioxidantes, mas contradiz alguns resultados de estudos anteriores no tratamento da DM experimental (Vessal, Hemmati *et al.*, 2003). As diferenças entre os achados devem-se ao período e à duração do tratamento com a orgoteína em nosso estudo, Nele foi administrado o antioxidante durante a última semana de um experimento de sessenta dias, ao contrário de outros estudos, que realizaram tratamento concomitante com a indução. Em outros estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, a utilização de antioxidantes durante um período tardio de indução do diabetes por estreptozotocina não demonstrou atividade hipoglicemiante. Esse fato, também observado no presente estudo, demonstra que o modelo experimental induzido por estreptozotocina apresenta irreversibilidade do processo de indução apoptótica das células  $\beta$  pancreáticas,



mesmo utilizando um antioxidante que apresente benefícios frente às complicações crônicas do diabetes.

Em nosso trabalho de pesquisa, o peso corporal diminuiu significativamente quando comparado o grupo diabético com o grupo diabético tratado com o controle no final da oitava semana. Isso pode ocorrer em animais que permanecem por período muito prolongado em jejum, pois o glicogênio hepático está diminuído, e o glicerol é convertido em glicose. Como este mecanismo é muito limitado, o substrato para a formação da glicose sanguínea são as proteínas, justificando, assim, as diferenças por nós encontradas (Dias *et. al.* 2005).

Também encontramos aumento na lipoperoxidação hepática no DM e redução deste marcador de estresse oxidativo após o tratamento com a orgoteína. O processo de lipoperoxidação envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos, determinando o rearranjo das ligações duplas nos lipídios insaturados. A eventual degradação dos lipídios da membrana faz surgir uma série de produtos, incluindo alcoóis, cetonas, aldeídos e ésteres, os quais podem ser medidos pelas substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). A utilização da orgoteína proporcionou aumento da atividade endógena desta enzima e resultou em menor dano oxidativo na membrana celular.

Como o estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a geração das espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio e a capacidade de defesa corporal, tanto endógena quanto exógena, é de relevante importância o estudo da atividade das enzimas antioxidantes no DM. A expressão e a atividade das enzimas antioxidantes podem estar alteradas na presença de algum processo fisiopatológico. Estudos demonstram que a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx está diminuída em animais diabéticos (Hurdag, Uyaner *et al.*, 2008; Peixoto, Pessoa *et al.*, 2009). Outros autores, no entanto, demonstram aumento na atividade enzimática em animais diabéticos induzidos pela administração de estreptozotocina. Tais contradições podem ocorrer devido à especificidade do tecido avaliado, bem como à variação da severidade e ao tempo de doença.

Em nosso estudo, foi verificada redução na atividade da SOD e da GPx no DM e aumento significativo após a administração da orgoteína. A redução

na atividade da SOD no grupo DM pode ser explicada pela glicação no domínio heparino-ligante da superóxido dismutase extracelular (SODec) (Kawamura, Ookawara *et al.*, 1992; Fattman, Schaefer *et al.*, 2003). Este domínio ancora a proteína na superfície das células endoteliais e na matriz extracelular dos vasos sanguíneos. A afinidade com a heparina pode ser modulada por estados hiperglicêmicos através da glicação não enzimática dos resíduos de lisina da SODec, localizados no domínio heparino-ligante. A glicação determina perda da afinidade da heparina, mas mantém a atividade enzimática da SOD no meio extracelular (Kawamura, Ookawara *et al.*, 1992). Estudos em pacientes diabéticos demonstraram, no entanto, altas concentrações de SODec glicada sérica e reduções na atividade arterial desta enzima (Kawamura, Ookawara *et al.*, 1992; Oda, Bannai *et al.*, 1994). Os achados podem ser explicados devido ao fato de a glicação inibir a atividade da Cu,ZnSOD intracelular, e este processo afetar indiretamente a função da SODec (Fattman, Schaefer *et al.*, 2003). O NO e suas espécies reativas podem atravessar a membrana celular, modular o relaxamento do músculo liso e a resposta do tônus vascular. No meio extracelular, o NO pode estabelecer ligação com grande quantidade de superóxido, resultante do extenso processo de glicação de proteínas no DM. Portanto, a diminuição da concentração vascular de SODec, a redução da atividade da SOD intracelular e o aumento da produção do ânion superóxido estão envolvidos diretamente no processo patogênico do DM. A utilização da orgoteína demonstrou, em nosso estudo, que pode ter efeito benéfico de reversão desse processo.

A CAT apresentou aumento de atividade no DM e retorno dos valores basais após o tratamento com a orgoteína, ela é homoenzima que catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  para formar  $O_2$  e  $H_2O$ . O aumento da atividade da CAT pode ser resposta compensatória ao aumento na produção do  $H_2O_2$  no fígado dos animais diabéticos, pois a deficiência insulínica promove a  $\beta$ - oxidação de ácidos graxos, que resulta em maior formação de  $H_2O_2$ . (Aebi, 1984).

A SOD é importante enzima antioxidante que catalisa de maneira rápida a dismutação do radical superóxido e, dessa forma, atua como primeira linha de defesa antioxidante. No caso de deficiência da SOD ou do aumento da produção do superóxido, este preferencialmente reage com óxido nítrico e produz peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), que é um potente agente oxidante e nitrosante o

qual pode provocar dano direto a proteínas, lipídios e DNA (Pacher, Beckman *et al.*, 2007).

Diversos estudos apontam o envolvimento do NO e do radical superóxido no processo fisiopatológico das complicações crônicas do DM. Estudos demonstram essas alterações no fígado de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Stadler, Jenei *et al.*, 2003; Dias, Porawski *et al.*, 2005). Além disso, aparentemente, NO e outros radicais livres relacionados e espécies oxidantes são os maiores efetores de necrose das células  $\beta$ -pancreáticas (Pacher, Beckman *et al.*, 2007). Em nosso estudo, foi observada redução de 63% dos metabólitos do NO no grupo DM, e aumento de 55% dos níveis desses metabólitos após a administração da orgoteína. Ainda foi observada correlação positiva entre a atividade da enzima antioxidante SOD e os níveis de nitritos e nitratos ( $p=0,023$ ;  $r=0,565$ ). Esses achados demonstram maior disponibilidade de óxido nítrico nos animais diabéticos tratados com orgoteína, provavelmente devido ao aumento da atividade da enzima antioxidante SOD. A partir dos resultados, pôde-se estabelecer a ação direta da orgoteína, dismutando o radical superóxido, e a ação indireta desta droga relacionada com o NO (Pacher, Beckman *et al.*, 2007).

Peixoto e colaboradores (2009) investigaram os efeitos de um agente mimético da SOD, o tempol, sobre o estresse oxidativo renal em ratos diabéticos hipertensos. O estudo demonstrou melhora na função renal acompanhada pela melhora do estado redox com a utilização exógena da enzima. A melhora do estado redox pode ser comprovada pelo aumento da expressão da SODec no córtex renal em animais tratados com o mimético da SOD, além de redução da geração de espécies reativas de oxigênio (Peixoto, Pessoa *et al.*, 2009). No estudo de Peixoto e colaboradores, as ações do tempol assemelham-se às da orgoteína no presente estudo.

Ren e colaboradores (2008) demonstraram, em modelo experimental de indução por estreptozotocina, o dano mitocondrial hepático ocasionado pela nitração de proteínas. Nele, foram analisadas a ultraestrutura mitocondrial dos hepatócitos através da microscopia eletrônica e as expressões da iNOS e da nitrotirosina representando o estresse nitrosativo nos tecido hepático. O grupo de animais diabéticos apresentou um importante dano estrutural nas mitocôndrias hepáticas, assim como aumento das expressões da INOS e da

nitrotirosina, podendo relacionar-se a nitração das proteínas ao dano das estruturas mitocondriais. A utilização, neste estudo, da aminoguanidina, droga inibidora da iNOS, demonstrou redução do dano nitrosativo e mitocondrial. Considerando-se a importância do estresse nitrosativo e oxidativo hepático no diabetes, a utilização de um agente antioxidante que reduz a formação do radical superóxido, como a orgoteína, ou que inibe a formação excessiva do óxido nítrico, como a aminoguanidina, pode apresentar um benefício terapêutico para essa doença (Ren, Li *et al.*, 2008).

O DM, através do desequilíbrio no estado redox, desencadeia a ativação de fatores de transcrição nuclear como o NFκB. A forma nuclear do fator de transcrição NFκB se liga ao DNA como um heterodímero de 50 kDa (p50) e 65 kDa (p65). A subunidade p65 é responsável pelo potencial de ativação do NFκB (Baeuerle *et al.* 1991). A ativação desse fator é responsável pelo aumento na expressão da iNOS. Em nosso estudo, assim como no estudo de Dias e colaboradores (Dias, Porawski *et al.*, 2005), ocorreu aumento na expressão da p65 nuclear e da iNOS, demonstrando indiretamente a ativação do NFκB no DM experimental. A utilização da orgoteína não reduziu, entretanto, a p65. Estudos experimentais demonstram que a utilização de antioxidantes pode reduzir o estresse oxidativo e inibir a ativação de fatores de transcrição redox-dependentes (Dias, Porawski *et al.*, 2005). Em nosso estudo, a administração da orgoteína determinou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no estresse oxidativo, essas alterações não estabeleceram, entretanto, modificações na p65. Houve aumento na expressão da iNOS, que ficou ainda mais evidente após a administração da orgoteína.

Com a finalidade de investigar as alterações hepáticas do modelo de diabetes induzido por estreptozotocina, Natsumi e colaboradores (2008) analisaram a expressão de proteínas transportadoras de xenobióticos e componentes da bile e a expressão da p65 do NFκB. Os autores concluíram que proteínas transportadoras hepáticas alteradas afetam a distribuição de xenobióticos e que o aumento da transcrição do NFκB é um dos fatores responsáveis. (Kameyama, Arisawa *et al.*, 2008) O estudo reforça a importância de fatores redox-dependentes na fisiopatogenia hepática do diabetes mellitus, podendo-se transpor esses dados para a clínica.

Lee e colaboradores (2009) realizaram estudo *in vitro* de células RAW 264.7, estimuladas por lipossacarídeos a produzirem espécies reativas de oxigênio. A linhagem de células possuía permeabilidade a SOD. No estudo, foi observada a inibição dose-dependente da iNOS e da ativação do NFκB pela aplicação da SOD no meio de cultura (Lee, Song *et al.*, 2009). Os resultados da administração da SOD exógena, em nosso modelo experimental, diferem de outros achados de estudos *in vitro* que demonstraram a regulação da iNOS pela enzima antioxidante SOD (Han, Kwon *et al.*, 2001; Lee, Song *et al.*, 2009).

Existem poucos estudos experimentais que relacionam a utilização de agentes miméticos da SOD a modificações da iNOS no DM. Kawakami e colaboradores (2009) utilizaram o mimético da SOD tempol para o tratamento da disfunção erétil de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Como desfecho principal do estudo, encontrou-se a análise das expressões da iNOS e da forma constitutiva da óxido nítrico sintase, a eNOS. Nesse estudo, o tempol foi eficaz ao reduzir a expressão da iNOS e melhorar a funcionalidade erétil dos ratos diabéticos (Kawakami, Urakami *et al.*, 2009). O estudo de Kawakami não analisou, porém, outros marcadores de estresse oxidativo, como o NFκB, que foi analisado em nosso estudo.

No presente modelo experimental de diabetes, a administração da orgoteína apresentou capacidade de modular a atividade das enzimas antioxidantes, reduzir a lipoperoxidação e melhorar a biodisponibilidade do óxido nítrico. Contudo, possivelmente devido à administração da orgoteína, de maneira tardia, na última semana de um experimento de alterações crônicas, tais melhoras não foram observadas nos níveis transcricionais das proteínas p65 e iNOS.

Conclui-se que o tratamento com a orgoteína reduz o estresse oxidativo hepático em animais diabéticos e melhora a atividade das enzimas antioxidantes, mesmo não alterando a ativação do fator de transcrição nuclear NFκB. Não há, no entanto, alteração significativa na p65 e na iNOS, o que justifica a realização de novos estudos sobre a utilização de antioxidantes exógenos em modelos experimentais para o tratamento do DM.

## CONCLUSÕES

- 1) O peso corporal dos animais diabéticos foi menor do que o controle após sessenta dias de doença, e a orgoteína não reverteu essa alteração.
- 2) A glicemia não sofreu redução nos animais diabéticos, mesmo após a administração da orgoteína.
- 3) A orgoteína reduziu a lipoperoxidação nos animais diabéticos.
- 4) Houve melhora na atividade das enzimas antioxidantes Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).
- 5) Os nitritos e nitratos totais estava reduzido nos animais diabéticos, e a orgoteína aumentou os valores.
- 6) A iNOS e a proteína p65 do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) aumentaram nos animais diabéticos, e a orgoteína não reverteu essa alteração.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Analisar as expressões das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) no modelo experimental de DM e os efeitos do tratamento com a orgoteína sobre essas proteínas.

Investigar o envolvimento do modelo experimental de DM com a fisiopatogenia de doenças hepáticas resultantes da resistência à insulina.

Investigar a isoforma constitutiva da óxido nítrico sintase no mesmo modelo.

Avaliar as expressões de outras proteínas envolvidas com a ativação do NF $\kappa$ B: complexo IKK (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ), inibidores da fosforilação dos complexo IKK(IkBs) e inibidores do NF $\kappa$ B (IkB e IkB- $\beta$ ).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, v.105, p.121-6. 1984.
- Amato, A. M., L. Calcagno, *et al.* [Intra-articular orgotein and corticosteroids in rheumatoid arthritis: comparative clinical results]. Clin Ter, v.119, n.2, Oct 31, p.119-25. 1986.
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, v.28 Suppl 1, Jan, p.S37-42. 2005.
- Baeuerle PA. The inducible transcription activator NF-kappa B: regulation by distinct protein subunits. Biochim Biophys Acta. Apr 16;1072(1):63–80. 1991.
- Biehl, G. [Clinical experiences with orgotein in the treatment of arthrosis deformans and extra-articular diseases]. Eur J Rheumatol Inflamm, v.4, n.2, p.219-27. 1981.
- Bonnefont-Rousselot, D. Glucose and reactive oxygen species. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, v.5, n.5, Sep, p.561-8. 2002.
- Borrelli, F., C. Serafini, *et al.* Additional pharmacological aspects of orgotein, a metalloprotein with superoxide-dismutase activity. Arzneimittelforschung, v.29, n.5, p.781-5. 1979.
- Boveris, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. Medicina (B Aires), v.58, n.4, p.350-6. 1998.
- Bresson, D. e M. Von Herrath. Immunotherapy after recent-onset type 1 diabetes: combinatorial treatment for achieving long-term remission in humans? Rev Diabet Stud, v.1, n.3, Fall, p.108-12. 2004.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.813-20. 2001.
- Buege, J. A. e S. D. Aust. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol, v.52, p.302-10. 1978.
- Carson, S., E. E. Vogin, *et al.* Safety tests of orgotein, an antiinflammatory protein. Toxicol Appl Pharmacol, v.26, n.2, Oct, p.184-202. 1973.
- Ceriello, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. Diabetes Care, v.26, n.5, May, p.1589-96. 2003.
- Cuzzocrea, S., D. P. Riley, *et al.* Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev, v.53, n.1, Mar, p.135-59. 2001.



- Das Evcimen, N. e G. L. King. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. Pharmacol Res, v.55, n.6, Jun, p.498-510. 2007.
- Degenhardt, T. P., S. R. Thorpe, *et al.* Chemical modification of proteins by methylglyoxal. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), v.44, n.7, Nov, p.1139-45. 1998.
- Del Maestro, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. Acta Physiol Scand Suppl, v.492, p.153-68. 1980.
- Deneke, S. M. e B. L. Fanburg. Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol, v.257, n.4 Pt 1, Oct, p.L163-73. 1989.
- Devangelio, E., F. Santilli, *et al.* Soluble RAGE in type 2 diabetes: association with oxidative stress. Free Radic Biol Med, v.43, n.4, Aug 15, p.511-8. 2007.
- Dias, A. S., M. Porawski, *et al.* Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr, v.135, n.10, Oct, p.2299-304. 2005.
- Engerman, R. L., T. S. Kern, *et al.* Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. Diabetologia, v.37, n.2, Feb, p.141-4. 1994.
- Esco, R., J. Valencia, *et al.* Efficacy of orgotein in prevention of late side effects of pelvic irradiation: a randomized study. Int J Radiat Oncol Biol Phys, v.60, n.4, Nov 15, p.1211-9. 2004.
- Evans, J. L., I. D. Goldfine, *et al.* Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? Diabetes, v.52, n.1, Jan, p.1-8. 2003.
- Fattman, C. L., L. M. Schaefer, *et al.* Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. Free Radic Biol Med, v.35, n.3, Aug 1, p.236-56. 2003.
- Forbes, J. M., M. E. Cooper, *et al.* Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. J Am Soc Nephrol, v.14, n.8 Suppl 3, Aug, p.S254-8. 2003.
- Fridovich, I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J Biol Chem, v.245, n.16, Aug 25, p.4053-7. 1970.
- Goebel, K. M. e U. Storck. Effect of intra-articular orgotein versus a corticosteroid on rheumatoid arthritis of the knees. Am J Med, v.74, n.1, Jan, p.124-8. 1983.
- Goh, S. Y. e M. E. Cooper. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. J Clin Endocrinol Metab, v.93, n.4, Apr, p.1143-1152. 2008.
- Goldin, A., J. A. Beckman, *et al.* Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation, v.114, n.6, Aug 8, p.597-605. 2006.
- Grosser, A., F. Stark, *et al.* [Treatment of hypertrophic scars and keloids with Orgotein]. Hautarzt, v.35, n.7, Jul, p.377-8. 1984.

- Gustafson, H., B. Johansson, *et al.* Peyronie's disease: experience of local treatment with Orgotein. Eur Urol, v.7, n.6, p.346-8. 1981.
- Guntzler, W. A. e Flohe, L. Glutathione peroxidase. En: *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Ed. R.A. Greenmald. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 285-290, 1985.
- Halliwell, B. E Gutteridge, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine, 2Ed., Oxford University Press, Oxford, 1989.
- Han, Y. J., Y. G. Kwon, *et al.* Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF-kappa B activation: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. Nitric Oxide, v.5, n.5, p.504-13. 2001.
- Hawkins, M., N. Barzilai, *et al.* Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. J Clin Invest, v.99, n.9, May 1, p.2173-82. 1997.
- Huber, W. Orgotein--(bovine Cu-Zn superoxide dismutase), an anti-inflammatory protein drug: discovery, toxicology and pharmacology. Eur J Rheumatol Inflamm, v.4, n.2, p.173-82. 1981.
- Hurdag, C., I. Uyaner, *et al.* The effect of alpha-lipoic acid on NOS dispersion in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats. J Diabetes Complications, v.22, n.1, Jan-Feb, p.56-61. 2008.
- Ianev, V. e D. Tsvetkov. [The conservative treatment of Peyronie's disease with orgotein]. Khirurgiia (Sofia), v.42, n.6, p.57-9. 1989.
- Joral, A., T. Boyano, *et al.* Systemic anaphylaxis following parenteral orgotein administration. J Investig Allergol Clin Immunol, v.3, n.2, Mar-Apr, p.103-4. 1993.
- Kameyama, N., S. Arisawa, *et al.* Increase in P-glycoprotein accompanied by activation of protein kinase Calpha and NF-kappaB p65 in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. Biochim Biophys Acta, v.1782, n.5, May, p.355-60. 2008.
- Kawakami, T., S. Urakami, *et al.* Superoxide dismutase analog (Tempol: 4-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine 1-oxyl) treatment restores erectile function in diabetes-induced impotence. Int J Impot Res, v.21, n.6, Nov-Dec, p.348-55. 2009.
- Kawamura, N., T. Ookawara, *et al.* Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab, v.74, n.6, Jun, p.1352-4. 1992.
- Klug, D., J. Rabani, *et al.* A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. J Biol Chem, v.247, n.15, Aug 10, p.4839-42. 1972.
- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev, *et al.* High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. FEBS Lett, v.416, n.1, Oct 13, p.15-8. 1997.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

- Landis, G. N. e J. Tower. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. Mech Ageing Dev, v.126, n.3, Mar, p.365-79. 2005.
- Lee, J. A., H. Y. Song, *et al.* Differential regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by superoxide dismutase in lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 cells. Exp Mol Med, v.41, n.9, Sep 30, p.629-37. 2009.
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4epiadriamycin in mice. Tumori. 1985;71(3):2419.
- Like, A. A. e A. A. Rossini. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. Science, v.193, n.4251, Jul 30, p.415-7. 1976.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.
- Lund-Olesen, K. Intrathecal orgotein. Int J Clin Pharmacol Res, v.5, n.1, p.59-62. 1985.
- Machlin, L. J. e A. Bendich. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. Faseb J, v.1, n.6, Dec, p.441-5. 1987.
- Marberger, H., G. Bartsch, *et al.* Orgotein: a new drug for the treatment of radiation cystitis. Curr Ther Res Clin Exp, v.18, n.3, Sep, p.466-75. 1975.
- Marchioli, R., C. Schweiger, *et al.* Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. Lipids, v.36 Suppl, p.S53-63. 2001.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders, *et al.* Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol, v.17, n.1, p.24-38. 2003.
- Marshall, S., V. Bacote, *et al.* Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. J Biol Chem, v.266, n.8, Mar 15, p.4706-12. 1991.
- Maughann, R.; Glessonn, M.; Greenhaff, P. L. Biochemistry of exercise and training. 1<sup>a</sup> ed. Copyright, 2000.
- Maxwell, S. R. J. Prospects for the use of antioxidant therapies. Drugs. 49, 345-361, 1995.
- Meerson, F. Z., V. E. Kagan, *et al.* The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the antioxidant protection of the heart. Basic Res Cardiol, v.77, n.5, Sep-Oct, p.465-85. 1982.
- Ministério da Saúde. Taxa de prevalência de diabetes mellitus no Brasil. Brasil: [www.datasus.br](http://www.datasus.br) .2009.
- Misra, H. P. e I. Fridovich. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem, v.247, n.10, May 25, p.3170-5. 1972.

- Nassar, T., B. Kadery, *et al.* Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. Eur J Pharmacol, v.436, n.1-2, Feb 1, p.111-8. 2002.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature, v.404, n.6779, Apr 13, p.787-90. 2000.
- Oda, A., C. Bannai, *et al.* Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by in vitro glycosylation and in erythrocytes of diabetic patients. Horm Metab Res, v.26, n.1, Jan, p.1-4. 1994.
- Pacher, P., J. S. Beckman, *et al.* Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiol Rev, v.87, n.1, Jan, p.315-424. 2007.
- Peixoto, E. B., B. S. Pessoa, *et al.* Antioxidant SOD mimetic prevents NADPH oxidase-induced oxidative stress and renal damage in the early stage of experimental diabetes and hypertension. Am J Nephrol, v.29, n.4, p.309-18. 2009.
- Puhl, W., G. Biehl, *et al.* [Results of a multicenter orgotein study in gonarthrosis]. Eur J Rheumatol Inflamm, v.4, n.2, p.264-70. 1981.
- Ren, X. Y., Y. N. Li, *et al.* Peroxynitrite-induced protein nitration contributes to liver mitochondrial damage in diabetic rats. J Diabetes Complications, v.22, n.5, Sep-Oct, p.357-64. 2008.
- Rolo, A. P. e C. M. Palmeira. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol, v.212, n.2, Apr 15, p.167-78. 2006.
- Sadi, G., O. Yilmaz, *et al.* Effect of vitamin C and lipoic acid on streptozotocin-induced diabetes gene expression: mRNA and protein expressions of Cu-Zn SOD and catalase. Mol Cell Biochem, v.309, n.1-2, Feb, p.109-116. 2008.
- Schiekofer, S., M. Andrassy, *et al.* Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. Diabetes, v.52, n.3, Mar, p.621-33. 2003.
- Schmidt, A. M. e D. M. Stern. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. Trends Endocrinol Metab, v.11, n.9, Nov, p.368-75. 2000.
- Schmidt, H. H., P. Wilke, *et al.* Enzymatic formation of nitrogen oxides from L-arginine in bovine brain cytosol. Biochem Biophys Res Commun, v.165, n.1, Nov 30, p.284-91. 1989.
- Soulis-Liparota, T., M. Cooper, *et al.* Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. Diabetes, v.40, n.10, Oct, p.1328-34. 1991.
- Southorn, P. A. e G. Powis. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc, v.63, n.4, Apr, p.381-9. 1988.

- Stadler, K., V. Jenei, *et al.* Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. Free Radic Biol Med, v.35, n.10, Nov 15, p.1240-51. 2003.
- Stroker, W. e A. Schlutz. [Treatment of contracted bladder with orgotein. Report of experiences]. Urologe A, v.25, n.4, Jul, p.209-12. 1986.
- Throckmorton, D. C., A. P. Brogden, *et al.* PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. Kidney Int, v.48, n.1, Jul, p.111-7. 1995.
- Twigg, S. M., Z. Cao, *et al.* Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. Endocrinology, v.143, n.12, Dec, p.4907-15. 2002.
- Unwin, N., D. Gan, *et al.* The IDF Diabetes Atlas: providing evidence, raising awareness and promoting action. Diabetes Res Clin Pract, v.87, n.1, Jan, p.2-3.
- Valencia, J., C. Velilla, *et al.* The efficacy of orgotein in the treatment of acute toxicity due to radiotherapy on head and neck tumors. Tumori, v.88, n.5, Sep-Oct, p.385-9. 2002.
- Vessal, M., M. Hemmati, *et al.* Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, v.135C, n.3, Jul, p.357-64. 2003.
- Villani, U., S. Leoni, *et al.* [Orgotein in the treatment of cystalgia with clear urine]. J Urol (Paris), v.92, n.4, p.264-5. 1986.
- Vlassara, H. Advanced glycosylation in nephropathy of diabetes and aging. Adv Nephrol Necker Hosp, v.25, p.303-15. 1996.
- Wendt, T., E. Harja, *et al.* RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. Atherosclerosis, v.185, n.1, Mar, p.70-7. 2006.
- Wild, S., G. Roglic, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, v.27, n.5, May, p.1047-53. 2004.
- Xia, P., T. Inoguchi, *et al.* Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. Diabetes, v.43, n.9, Sep, p.1122-9. 1994.
- Zimmet, P., K. G. Alberti, *et al.* Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.782-7. 2001.

## ANEXOS

### Artigo 1

Revista: Experimental Diabetes Research












#### **Effect of Agaricus blazei Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes**

Fabio Cangeri Di Naso, Rodrigo Noronha de Mello, Alexandre Simões Dias, Marilene Porawski, Alexandre de Barros Falcão Ferraz, Silvia Bona, Norma Anair Possa Marroni, and Marc François Richter

Received 30 October 2009; Revised 7 January 2010; Accepted 4 March 2010

Academic Editor: Subrata K. Chakrabarti

#### EDR/543926.v3 (Research Article)

Details	Author Actions	Manuscript history
<b>Title</b>	 Effect of Agaricus blazei Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes	
<b>Issue</b>	regular	
<b>Additional Files</b>	 Reply to review reports	
<b>Manuscript No.</b>	543926.v3 (Research Article)	
<b>Resubmitted On</b>	2010-03-02	
<b>Authors</b>	 <b>Fabio Cangeri Di Naso</b> ,  Rodrigo Noronha de Mello,  Alexandre Simões Dias,  Marilene Porawski,  Alexandre de Barros Falcão Ferraz,  Silvia Bona,  Norma Anair Possa Marroni,  Marc François Richter	
<b>Editor</b>	 Subrata K. Chakrabarti (Assigned on 2010-03-02)	
<b>Editorial Recommendation</b>	Publish Unaltered (Made On 2010-03-04)	
<b>Editorial Decision</b>	Accepted (Made On 2010-03-04)	

## Research Article

# Effect of *Agaricus blazei* Murill on the Pulmonary Tissue of Animals with Streptozotocin-Induced Diabetes

Fábio Cangeri Di Naso,<sup>1,2,3</sup> Rodrigo Noronha de Mello,<sup>1,2,3</sup> Alexandre Simões Dias,<sup>1,2,3</sup> Marilene Porawski,<sup>1,2,3</sup> Alexandre de Barros Falcão Ferraz,<sup>1,2,3</sup> Silvia Bona,<sup>1,2,3</sup> Marc François Richter,<sup>1,2,3</sup> and Norma Anair Possa Marroni<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS 110, Brazil

<sup>2</sup> Universidade Luterana do Brasil, Canoas/RS, Brazil

<sup>3</sup> Centro Universitário Metodista IPA, Porto Alegre/RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Norma Anair Possa Marroni, nmarroni@terra.com.br

Received 30 October 2009; Revised 7 January 2010; Accepted 4 March 2010

Academic Editor: Subrata K. Chakrabarti

Copyright © 2010 Fábio Cangeri Di Naso et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The present study was designed to evaluate the oxidative stress as well as the therapeutic effect of *Agaricus blazei* Muril (*A. Blazei*) in rats with streptozotocin-induced diabetes. We used 25 Wistar rats, and DM was induced by injecting streptozotocin (70 mg/Kg i.p.). *Agaricus blazei* Muril was administered daily starting 40 days after disease onset. *A. Blazei* was tested as an aqueous extract for its phytochemical composition, and its antioxidant activity in vitro was also evaluated. Lipoperoxidation (LPO), and superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase activities were measured in the pulmonary tissue, as well as the presence of inducible nitric oxide synthase (iNOS), through immunohistochemistry. An anatomopathologic study was also performed. Phytochemical screening of *A. Blazei* detected the presence of alkaloids and saponins. The extract exhibited a significant antioxidant activity in the DPPH-scavenging and the hipoxanthine/xanthine oxidase assays. Pulmonary LPO increased in diabetic animals ( $0.43 \pm 0.09$ ;  $P < .001$ ) as compared to the control group ( $0.18 \pm 0.02$ ), followed by a reduction in the *A. Blazei*-treated group ( $0.33 \pm 0.04$ ;  $P < .05$ ). iNOS was found increased in the lung in diabetic rats and reduced in the *A. Blazei*-treated group. The pulmonary tissue in diabetic rats showed oxidative alterations related to the streptozotocin treatment. The *A. Blazei* treatment effectively reduced the oxidative stress and contributed to tissue recovery.

## 1. Introduction

**1** *Diabetes mellitus* (DM) is an endocrine metabolic disease of growing incidence and clinical relevance with high morbidity and mortality rates [1]. Among its chronic complications are the micro- and macro vascular disorders related to the renal, cardiovascular, and nervous systems [2]. However, in the last two decades, changes in the respiratory function have also been reported in clinical and experimental studies. Decreases in the pulmonary function over the years, related to the decreased measures of pulmonary volumes and capacity, were evidenced in diabetic patients with impaired metabolic control [3, 4]. Structural alterations to the basal membrane of the pulmonary capillary endothelium are also

present in DM, with a thickening of the alveolus-capillary membrane and reduction in the diffusional capability [5, 6]. Moreover, diabetic patients are more susceptible to lung infections, in particular tuberculosis, which has a four-times greater incidence in this particular population [7, 8]. Although all these alterations were evidenced in clinical and experimental studies, few studies investigated the main physiopathologic mechanisms involving pulmonary complications related to DM.

There are 4 pathways associated with chronic complications of DM, namely, the polyol pathway, protein kinase C (PKC) activation, increased flow in the hexosamine pathway, and the pathway of advanced glycosilation end-products (AGE). Although presenting differently in each

case, oxidative stress (OS) is implicated in the four pathways cited above [9].

There is plenty of evidence showing that the increase of nitric oxide (NO), formed by the action of inducible nitric oxide synthase (iNOS) is one of the factors responsible for both the pathogenesis and the complications resulting from DM [10, 11]. The use of exogenous antioxidants may represent a great therapeutic potential for treatment of DM [12–14].

The basidiomycete *Agaricus blazei* Murill (*A. Blazei*), popularly known as “sun mushroom”, is native to Brazil and widely grown in Japan because of its medicinal properties. This mushroom is traditionally used in the treatment of atherosclerosis, hepatitis, hyperlipidemia, dermatitis, and cancer, and it has been shown to have immunomodulating and antimutagenic effects both in vivo and in vitro. Polysaccharides  $\alpha$ -glycan and  $\beta$ -glycan are responsible for the function of immunological and antitumoral stimulation [15–17].

*A. Blazei* has already been shown to be beneficial in insulin resistance related to type 2 diabetes, but no study has shown the antioxidant potential of *A. Blazei* in vivo in DM [17]. Thus, this study was designed to evaluate the oxidative stress as well as the therapeutic effect of *A. Blazei* in the pulmonary tissue of animals with streptozotocin-induced DM.

## 2. Methods

**2.1. Mushrooms.** Air-dried mushrooms of the species *Agaricus blazei* Murill (C type) were a gift from Dr. Luiz Antônio Graciollo, Department of Engineering at the State University of São Paulo (UNESP), Brazil.

**2.2. Preparation of *A. blazei* Aqueous Extract.** Air-dried parts (100 g) were milled and the aqueous extracted was prepared by infusion (1/10 mushroom/solvent). The infusion stood at room temperature for 30 minutes. After cooling and filtration, the extract was frozen and concentrated by lyophilization for five days overnight, in order to obtain the *A. blazei* aqueous extract.

**2.3. Chemicals and Reagents.** 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), hypoxanthine, xanthine oxidase, trolox, and salicylic acid were purchased from Sigma (St. Louis, USA).

**2.4. Phytochemical Screening.** The phytochemical analysis (flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids, saponins, coumarins and cardiac glycosides) of *A. blazei* was carried out according to the methods described by Harborne [18]. The thin layer chromatography analyses were performed following systems and developers indicated by Wagner and Bladt [19].

**2.5. Hypoxanthine/Xanthine Oxidase Assay.** The method employed to assay the hydroxyl radical scavenging ability of the extracts was based on the method of Owen et al. [20]. Briefly, the extract was dissolved in the assay

buffer (hypoxanthine, Fe(III), EDTA and salicylic acid) at a concentration of 2.0 mg/mL and diluted appropriately (in triplicate) in assay buffer to a final volume of 1.0 mL giving a range of 0.1–2.0 mg/mL. A 5  $\mu$ L aliquot of xanthine oxidase dissolved in 3.2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was added to initiate the reaction. The sample tubes were incubated for 3 hours at 37°C, at which time the reaction was complete. A 30  $\mu$ L aliquot of the reaction mixture was analyzed by HPLC using chromatographic conditions as described by Owen et al. [21, 22]. Chromatographic analysis was done using a gradient based on methanol/water/acetic acid with a  $\mu$ BondaPak C18 reverse phase column and detection at 325 nm. The HPLC equipment had a 2695 separation module and UV detector 2487. The hydroxylation of salicylic acid and hypoxanthine were monitored at  $\lambda = 325$  and  $\lambda = 278$  nm, respectively. The amount of dihydroxyphenols (2,5-dihydroxybenzoic acid and 2,3-dihydroxybenzoic acid) (2,5-DHBA and 2,3-DHBA) produced by hydroxyl radical ( $\text{OH}\cdot$ ) attack on salicylic acid was determined from standard curves prepared with the respective pure dihydroxyphenols.

**2.6. DPPH-Scavenging Assay.** Scavenging of DPPH free radical was measured using a modified method described by Yamaguchi et al. [23] in which the different methanolic plant extracts were added to Tris-HCl (100 mM) buffer, pH 7.0, containing 250 mM DPPH dissolved in methanol. At least six different dilutions of each extract were tested, and allowed to stand 20 minutes in the dark, before absorbance was measured at 517 nm using a Shimadzu spectrophotometer model UV-1602PC (Kyoto, Japan). The experiment was conducted in triplicate. Antioxidant activity (AOA) was expressed as  $\text{IC}_{50}$  (inhibitory concentration in  $\mu\text{g/mL}$  of samples or positive controls necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50% compared to the negative control). The lower the  $\text{IC}_{50}$ , the higher is the AOA [23].

**2.7. Animals and Experimental Protocol.** The experimental protocol used complied with the norms established by the Ethical and Health Research Committee of the Group of Research and Postgraduate Studies of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre as well as with the *Principles for Research Involving Animals* (NAS). Only male Wistar rats were used, obtained from the breeding colony of the Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The mean weight of animals at the start of the study was 200–300 grams. They were kept under a 12 : 12 hours light/dark cycle (light from 7 a.m. to 7 p.m.) in a temperature-controlled environment ( $22 \pm 4^\circ\text{C}$ ).

DM was induced by a single injection of streptozotocin i.p. (STZ, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) at a dose of 70 mg/Kg of body weight [24]. STZ was dissolved in sodium citrate buffer (0.1 M, pH 4.5) and administered in the left abdominal region of the animal about 10 minutes after dissolution in the buffer solution. The animals in the control group received only NaCl 0.9% i.p. at the same volume of the buffer used to dissolve STZ. The *A. blazei* extract was diluted to the concentration of 0.1 g/mL (10%) in a solution of distilled water and left for 2 hours at room temperature



[25]. The administration route was gastric gavage with a final solution of 2 mL and treatment was initiated from the 40th day of diabetes induction. The animals were randomized in the different groups: control (CO), diabetic treated with NaCl (DM), and diabetic treated with *A. blazei* (DM + *A. blazei*). Blood samples were collected from the retro-orbital plexus one day before induction, and 2 and 30 days after the beginning of the experiment. At the end of the 60 days of trial the animals was induce to euthanasia by exsanguination, after anesthetized with xilasine and ketamine. Blood from the retro-orbital plexus was sampled and the right lung was dissected out and kept in 4% formaldehyde for histological analysis. The left lung was removed and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for additional analyses.

**2.8. Serum Analyses.** The blood samples were placed into a testing tube with heparin (Liquemine) to avoid coagulation. The material was then centrifuged at  $1.800 \times g$  for 15 minutes. The precipitate was discarded and the plasma removed.

To determine glucose, cholesterol and triglycerides levels we used the colorimetric enzymatic test (Kit Labtest, Bio Diagnóstica) and absorbance was measured in spectrophotometer (CARY 3E-UV-Visible Spectrophotometer Varian). Animals with a glucose concentration above 250 mg/dL [26] were considered as diabetic.

**2.9. Biochemical Analyses of Oxidative Stress and Antioxidant Assay.** The lungs were homogenized with 9 mL of phosphate buffer (KCL 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) per gram of tissue. The protein concentration in these lung homogenates was determined using a standard solution of bovine albumin according to Lowry et al. [27].

Pulmonary lipoperoxidation was determined by the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBA-RS) [28].

Superoxide dismutase (SOD) activity in the lung tissue was determined using a technique based on the inhibition of adrenochrome formation in epinephrine autoxidation [29]. Catalase (CAT) activity in the lung tissue was determined as described elsewhere [30] and the determination of selenium-dependent glutathione peroxidase in the lung tissue was obtained through a technique consisting in the measure of NADPH oxidation by glutathione reductase [31].

**2.10. Histological Study.** For the histological analysis the samples were embedded in paraffin twice. Using a microtome, the paraffin blocks were cut into 3- $\mu\text{m}$  seriate sections. In the staining phase, the slides were immersed in hematoxylin-eosin and picrosirius. In the dehydration phase, the structures went through three containers with absolute alcohol and two containers with xylol. Reading was performed with light microscopy (*Nikon Labophot*) at  $100\times$ . The analysis was performed by 2 pathologists who did not know the study details.

**2.11. Immunohistochemical Detection of iNOS.** Immunohistochemical reactions were performed in the lung tissue sections through the technique of streptavidin-biotin peroxidase complex (StreptABC, DAKO). The slides were previously coated by a silane solution (APTS, Sigma) diluted in 4% acetone. 3- $\mu\text{m}$  thick sections were obtained using a mechanical microtome. The sections were then deparaffinized and successively immersed in xylol and ethanol and submitted to antigenic recovery by irradiation heat in pressure cooker (Eterna, Nigro) using citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 15 minutes. Peroxidase blocking was performed using a hydrogen peroxide solution at 3%, followed by incubation with primary antibody against NOS-2 (iNOS, 1:40, Santa Cruz). The reactions were marked with diaminobenzidine (DAB, Sigma) solution at 60 mg% and counterstained with Harris's hematoxylin (Merck). For each reaction a positive control was used to tissue that was known to be positive for the tested antibody. Two negative controls were also used, the first one by absence of the primary antibody and the second by removing the secondary antibody during the reaction steps. The cases were considered as iNOS-positive when the brown coloration of at least moderate intensity was visible in the cell cytoplasm and in more than 10% of the cells.

**2.12. Statistical Analysis.** The data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and were analyzed through statistical software SPSS 15.0. The variables were tested for normality through the Kolmogorov-Smirnov test. One-way analysis of variance (ANOVA) was used for intergroup differences. Student Newman-Keuls post hoc test was used for parametric variables and Kruskal-Wallis for the nonparametric ones. The level of significance used was  $P < .05$ .

### 3. Results

**3.1. Phytochemical Analyses.** Phytochemical analyses of *A. blazei* indicated the presence of saponins and alkaloids. Other secondary metabolites such as anthraquinones, cardiac glycosides, coumarins, flavonoids, phenolic acids and tannins were not detected.

**3.2. Hypoxanthine/Xanthine Oxidase In Vitro Assay.** The in vitro antioxidant activity of the extract was determined by monitoring the production of hydroxyl benzoic acids (DHBA) as a product of the hydroxyl radical attack on salicylic acid in the hypoxanthine-xanthine oxidase assay. The reduction of total oxidation products as a function of the concentration of *A. blazei* aqueous extract added to the assay resulted in an in vitro antioxidant capacity in a dose-dependent manner. The aqueous extract of *A. blazei* reduced the formation of both DHBA species to 45.2 % in the highest concentration used (2 mg/mL). The  $\text{IC}_{50}$  value was calculated and found to be 0.99 mg/mL. A second type of mushroom (*Lentinula edodes*) for which the authors did not find the presence of alkaloids was used as control sample ( $\text{IC}_{50}$  of 1.95 mg/mL). Trolox (vitamin E) was used as positive control and displayed an  $\text{IC}_{50}$  of 0.34 mg/mL (Figure 1).

TABLE 1: Inhibition of DPPH\*, IC<sub>50</sub> values for the DPPH assay of aqueous extracts of *Agaricus blazei* and *Lentinula edodes* mushrooms, and trolox.

Sample	Inhibition of DPPH (%)					IC <sub>50</sub> (mg/mL)
	0.1 µg/mL	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	
Trolox	91.27	93.53	96.71	99.03	99.89	0.02 ± 0.00
<i>Agaricus blazei</i>	7.28	10.77	17.09	46.32	48.81	1.77 ± 0.08
<i>Lentinula edodes</i>	2.19	4.68	8.33	18.56	30.63	3.22 ± 0.12

Mean ± standard deviation of three individual determinations. Results were based on the values measured at 20 minutes. Trolox was used as positive control. \*DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

TABLE 2: Changes in body weight and glucose, cholesterol and triglycerides plasma levels.

	N	Weight (g)	Glucose (mg/dL)	Total Cholesterol (mg/dL)	Triglycerides (mg/dL)
CO	5	442.00 ± 10.95	244.17 ± 68.01	28.35 ± 4.62	61.33 ± 33.43
DM	8	306.22 ± 32.11 <sup>†</sup>	482.37 ± 36.81*	42.88 ± 6.44*	161.00 ± 76.80 <sup>##</sup>
DM + <i>A. Blazei</i>	12	282.00 ± 44.11 <sup>‡</sup>	468.19 ± 62.46 <sup>‡</sup>	33.99 ± 5.23**	45.87 ± 10.61**

Data appear as mean ± SD. CO: Control, DM: Diabetes Mellitus and DM + *A. Blazei*: Diabetes Mellitus + *Agaricus blazei*.

<sup>†</sup> P < .001 CO versus DM.

<sup>‡</sup> P < .05 DM versus DM + *A. Blazei*.

\* P < .01 CO versus DM.

\*\* P < .01, DM versus DM + *A. Blazei*.

<sup>##</sup> P < .05 CO versus DM.

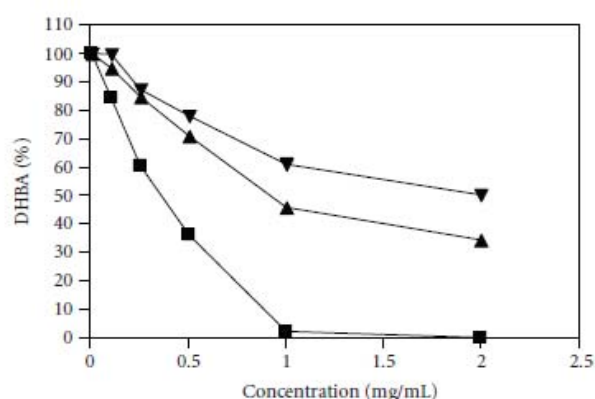


FIGURE 1: Inhibition of the generation of reactive oxygen species by aqueous extracts of aerial parts of *Agaricus blazei* (▲), *Lentinula edodes* (▼) and Trolox, used as positive control (■) using the hypoxanthine/xanthine oxidase system. Data points are presented as mean of ± SD, n = 3.

3.3. *DPPH-Scavenging Assay*. The free radical scavenging effect of the both of *A. blazei* aqueous extract, *L. edodes* aqueous extract, as well as trolox, as positive control, was tested, using the DPPH free radical scavenging assay [23]. The IC<sub>50</sub> values for *A. blazei* aqueous extract and for *L. edodes* extract are shown in Table 1. The results of the free radical scavenging effect of trolox (IC<sub>50</sub> = 0.02 mg/mL), used as positive control, was used to validate the assay. Although the free radical scavenging capacities of the extracts was lower (higher concentration are necessary to reduce the absorbance of DPPH by 50%) than the effect of trolox, the *A. blazei* aqueous extract (with highest flavanone content) presented promising antioxidant activity with an IC<sub>50</sub> of 1.77 mg/mL.

*L. edodes*, on the other hand, had the lowest scavenging activity (IC<sub>50</sub> = 3.22 mg/mL) which is in agreement with the absence of alkaloids in this species of mushroom.

3.4. *Body Weight and Serum Analyses*. The body weight of diabetic animals was significantly reduced, and *A. Blazei*-treated animals lost weight still more (Table 2). The *A. Blazei* extract apparently reduced glycemia in the diabetic rats (P < .01) but the glycemic curve was similar across diabetic and treated animals. However, *A. Blazei* significantly reduced the total cholesterol and triglycerides levels (P < .01). The DM and DM + *A. Blazei* groups had different sample sizes due the higher mortality of the animals of DM group during the experiment.

3.5. *Biochemical Analysis and Oxidative Stress*. *A. Blazei* significantly reduced (P < .05) the lipoperoxidation levels as determined by TBA-RS (Table 3). However, activity of antioxidant enzymes SOD and CAT did not show any differences between the groups. Enzyme GPx activity was significantly increased in the diabetic group and reduced in the *A. Blazei*-treated group (P < .05).

3.6. *Histological Analysis*. STZ-induced Diabetes Mellitus caused serious vascular injury to the pulmonary tissue (Figure 2(c)), where alveolar changes such as septa rupture were also evidenced. Picrosirius staining revealed an expansion of the conjunctive tissue in the alveolocapillary space of the diabetic group (Figure 2(d)) and an apparent reversion of this pattern in the Ab-treated group (Figure 2(f)).

3.7. *Immunohistochemical Analysis of iNOS*. Figure 3 shows iNOS distribution in the lung tissue as detected through immunohistochemistry. The positive stain in brown seen in

TABLE 3: Biochemical analyses of oxidative stress in lung tissue.

	TBARS (nmoles/mg of protein)	SOD (U/mg de protein)	CAT (pmoles/mg de protein)	GPx (nmoles/mg de protein)
CO	0.18 ± 0.02	76.33 ± 3.39	0.10 ± 0.04	0.41 ± 0.07
DM	0.43 ± 0.09*	69.32 ± 11.73	0.18 ± 0.07	1.10 ± 0.53*
DM + <i>A. Blazei</i>	0.33 ± 0.04**	74.84 ± 8.75	0.15 ± 0.03	0.45 ± 0.09**

Data appear as mean ± SD. CO: Control, DM: Diabetes Mellitus and DM + *A. Blazei*: Diabetes Mellitus+ *Agaricus blazei*.

\* $P < .01$  CO versus DM.

\*\* $P < .05$  DM versus DM + *A. Blazei*.

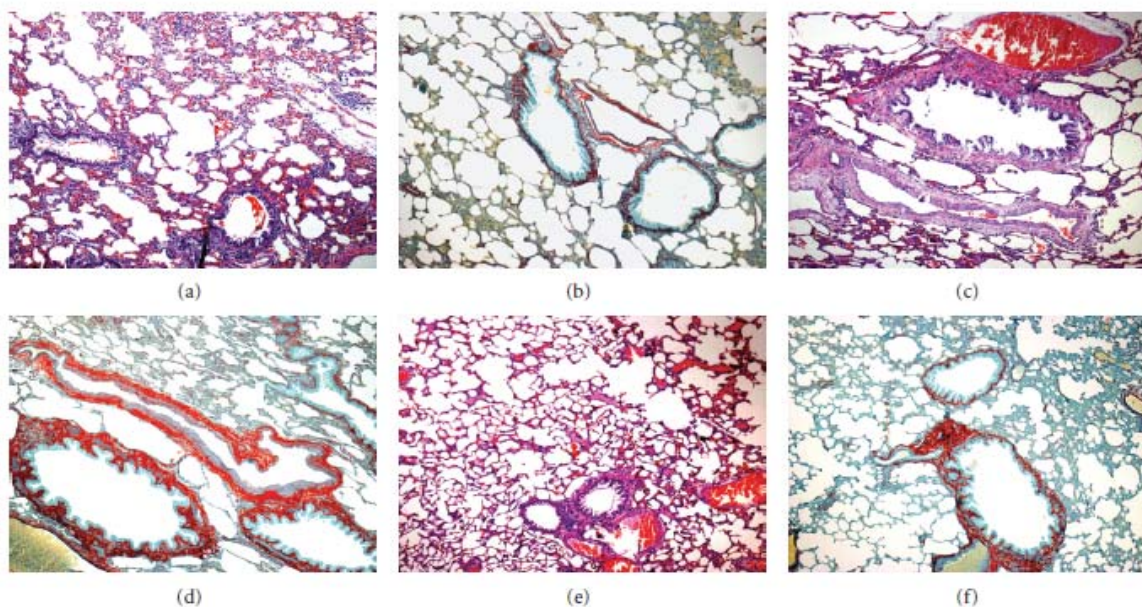


FIGURE 2: Histology of lung tissue stained by HE (a, c and e) and picosirius (b, d and f). Magnification 100×: (a) and (b): Control, (c) and (d): Diabetes Mellitus, (e) and (f): Diabetes Mellitus treated with *Agaricus blazei*.

the pulmonary bronchial epithelium and capillary endothelium in the DM group indicated iNOS positivity. iNOS staining was less apparent in the *A. Blazei* group and absent in the CO group.

#### 4. Discussion

Results of the free radical scavenging effect of the *A. blazei* aqueous extract in the hypoxanthine/xanthine oxidase in vitro assay, and in the DPPH free radical scavenging assay, showed a significant in vitro antioxidant activity. In both assays the extract expressed a higher antioxidant activity, in comparison with the aqueous extract of *L. edodes*, which is another species of mushroom and which presents only saponins, but not alkaloids, or flavonoids or tannins. It has been suggested by Ribeiro et al. that the antioxidant activity might be related to the presence of alkaloids in the mushroom. In other words, higher alkaloid concentrations generate better antioxidant activity [32].

The main finding of this study was the reduction of pulmonary lipoperoxidation in rats with streptozotocin-induced diabetes after treatment with *Agaricus blazei*. Previous studies have shown a glycemia-reducing effect, which

decreases insulin resistance and enhances the release of it by  $\beta$ -pancreatic cells [17, 33]. However, *A. Blazei* treatment here showed a beneficial effect regarding the variables related to the oxidative stress, despite not reducing hyperglycemia.

Kim et al. described antidiabetogenic effects of  $\beta$ -glucanes extracted from *A. Blazei* and its enzymatically hydrolyzed oligosaccharides, evaluating the in vitro and in vivo effects in culture of  $\beta$ -pancreatic cells and in animals with streptozotocin-induced diabetes. After treatment with  $\beta$ -glucanes and oligosaccharide the animals presented reductions in glycemia, triglycerides, and cholesterol levels and in atherosclerotic activity [34]. In our study, the treatment was performed using a gross extract of *A. Blazei*, without isolating any of its compounds, and this is probably the explanation for the lack of antiglycemic action.

The extract of *A. Blazei* demonstrated in vitro and in vivo antioxidant activity, however the treatment significantly reduced the weight of the animals. This fact could be explained due to high doses of *A. blazei* extract used in this experiment, differently of doses used in others studies that do not demonstrate weight reduction [34]. However, in a study to evaluate 90-day subchronic toxicity of an aqueous extract in rats, there were no consistent treatment-related changes in

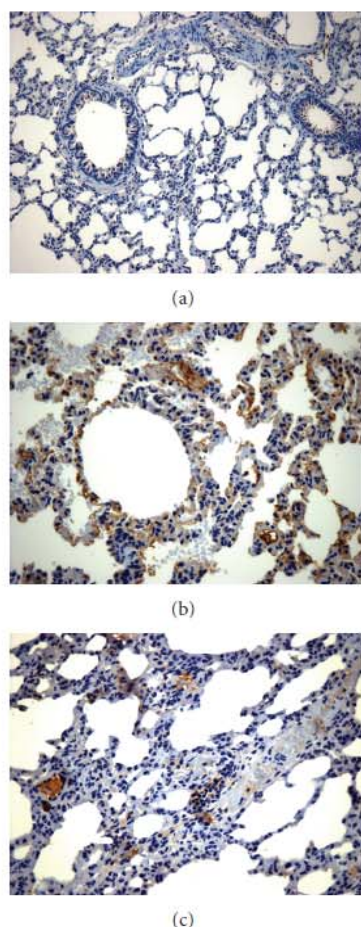


FIGURE 3: iNOS immunohistochemistry in lung tissue. Magnification 400 $\times$ : There was no staining in the control group (a); reduction in the treated group (b) versus DM (c).

clinical signs, body weight and food consumption at the dose of 2654 mg kg<sup>-1</sup> for male rat, a higher dose than used in our study [15]. More studies were necessary to evaluate the toxic effect of *A. Blazei* in these doses, with the analysis of specific variables.

GPx was significantly increased in the diabetic group and was significantly reduced after *A. Blazei* treatment. This increase in GPx can account for the diminished levels of reduced glutathione, as it is the main substrate regulating its activity. Gumieniczek et al. demonstrated that in experimental DM the pulmonary oxidative stress is present because of the reduction of antioxidant enzyme activity and increased lipoperoxidation. Such changes are more significant after weeks following induction. During DM there is a decrease of Cu,Zn-SOD activity and an increase of catalase activity [35]. In our study, neither SOD nor catalase activity were changed in none of the different groups. A possible explanation for our findings differing from those of Gumieniczek is that in our study the analysis of antioxidant enzymes was performed earlier.

In our experimental model numerous histological alterations were observed in the pulmonary system. These alterations are in agreement with those reported in the literature [7, 36, 37], especially as regards the increase in the conjunctive tissue and thickening of the basal lamina observed through the technique of picosirius staining. After treatment with *A. Blazei* such alterations became less evident. The formation of intra- and intermolecular binding with collagen, resulting from the process of glycosilation, leads to structural alterations in tissue proteins such as increase in rigidity, resistance to proteolytic digestion and the extracellular matrix (including fibronectin, procollagen  $\alpha_2$ , type III, IV and VI collagen, and laminina) [38, 39]. In our study, the main factor for the reversion of this process after treatment with *A. Blazei* can be explained by the reduction of damage resulting from the oxidative stress demonstrated by the reduction of pulmonary lipoperoxidation.

A long term hyperglycemic state is related to alterations in iNOS expression in several tissues [10]. In the immunohistochemical analysis of our study iNOS was significantly increased in the pulmonary tissue of the diabetic rats and significantly decreased when the animals were treated with *A. Blazei*. Studies have demonstrated that mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is reduced, whereas iNOS may be increased together with the generation of cyclic guanosine monophosphate (c-GMP) [14].

In a recently published study, lipoperoxidation, superoxide dismutase activity, and the distribution of iNOS and eNOS isoforms were evaluated in the lung tissue of diabetic rats. An increase in the oxidative stress concomitant with the increased iNOS in the lung tissue of diabetic rats was observed, which was reversed in the group treated with antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid [40]. These findings are in agreement with those reported in the present work, such as the observed increased oxidative stress, the histological pulmonary alterations, and the effect of an antioxidant therapy in this DM model.

The present study demonstrates the beneficial effect of *A. Blazei* aqueous extract regarding oxidative stress variables and pulmonary morphopathology in streptozotocin-induced diabetes. These findings may contribute significantly to a better understanding of the pulmonary physiopathology in DM. Our study is also relevant and with regard to the therapeutic potential of *A. Blazei*.

## References

- [1] P. Zimmet, K. G. Alberti, and J. Shaw, "Global and societal implications of the diabetes epidemic," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 782–787, 2001.
- [2] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 28, supplement 1, pp. S37–S42, 2005.
- [3] T. Nassar, B. Kadery, C. Lotan, N. Da'as, Y. Kleinman, and A. Haj-Yehia, "Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound tempol on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats," *European Journal of Pharmacology*, vol. 436, no. 1–2, pp. 111–118, 2002.
- [4] T. M. Davis, M. Knuiman, P. Kendall, H. Vu, and W. A. Davis,

- "Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: the fremantle diabetes study," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 50, no. 2, pp. 153–159, 2000.
- [5] B. Weynand, A. Jonckheere, A. Frans, and J. Rahier, "Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamina," *Respiration*, vol. 66, no. 1, pp. 14–19, 1999.
  - [6] K. Özşahin, A. Tuğrul, S. Mert, M. Yüksel, and G. Tuğrul, "Evaluation of pulmonary alveolo-capillary permeability in type 2 diabetes mellitus. Using technetium 99mTc-DTPA aerosol scintigraphy and carbon monoxide diffusion capacity," *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 20, no. 4, pp. 205–209, 2006.
  - [7] A. Kaparianos, E. Argyropoulou, F. Sampsonas, K. Karkoulas, M. Tsiamita, and K. Spiropoulos, "Pulmonary complications in diabetes mellitus," *Chronic Respiratory Disease*, vol. 5, no. 2, pp. 101–108, 2008.
  - [8] M. Marvisi, G. Marani, M. Brianti, and R. Della Porta, "Pulmonary complications in diabetes mellitus," *Recenti Progressi in Medicina*, vol. 87, no. 12, pp. 623–627, 1996.
  - [9] M. Brownlee, "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 813–820, 2001.
  - [10] P. Pacher, I. G. Obrosova, J. G. Mabley, and C. Szabó, "Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 3, pp. 267–275, 2005.
  - [11] I. G. Obrosova, et al., "Oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) activation in experimental diabetic neuropathy: the relation is revisited," *Diabetes*, vol. 54, no. 12, pp. 3435–3441, 2005.
  - [12] A. S. Dias, et al., "Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of Nutrition*, vol. 135, no. 10, pp. 2299–2304, 2005.
  - [13] R. Marchioli, C. Schweiger, G. Levantesi, L. Tavazzi, and F. Valagussa, "Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data," *Lipids*, vol. 36, supplement, pp. S53–S63, 2001.
  - [14] J. Bojunga, B. Dresar-Mayert, K.-H. Usadel, K. Kusterer, and S. Zeuzem, "Antioxidative treatment reverses imbalances of nitric oxide synthase isoform expression and attenuates tissue-cGMP activation in diabetic rats," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 316, no. 3, pp. 771–780, 2004.
  - [15] F. Firenzuoli, L. Gori, and G. Lombardo, "The medicinal mushroom *Agaricus blazei* murrill: review of literature and pharmaco-toxicological problems," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 5, no. 1, pp. 3–15, 2008.
  - [16] C.-H. Hsu, K.-C. Hwang, Y.-H. Chiang, and P. Chou, "The mushroom *Agaricus blazei* murill extract normalizes liver function in patients with chronic hepatitis B," *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 14, no. 3, pp. 299–301, 2008.
  - [17] C.-H. Hsu, Y.-L. Liao, S.-C. Lin, K.-C. Hwang, and P. Chou, "The mushroom *Agaricus blazei* Murill in combination with metformin and gliclazide improves insulin resistance in type 2 diabetes: a randomized, double-blinded, and placebo-controlled clinical trial," *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 97–102, 2007.
  - [18] J. B. Harborne, *Phytochemical Methods*, Clarendon Press, Oxford, UK, 1998.
  - [19] H. Wagner and S. Bladt, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Berlin, Germany, 1996.
  - [20] R. W. Owen, T. Wimonwatwatee, B. Spiegelhalter, and H. Bartsch, "A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 5, no. 4, pp. 233–240, 1996.
  - [21] R. W. Owen, A. Giacosa, W. E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalter, and H. Bartsch, "The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil," *European Journal of Cancer*, vol. 36, no. 10, pp. 1235–1247, 2000.
  - [22] R. W. Owen, R. Haubner, W. Mier, et al., "Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 41, no. 5, pp. 703–717, 2003.
  - [23] T. Yamaguchi, H. Takamura, T. Matoba, and J. Terao, "HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl," *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, vol. 62, no. 6, pp. 1201–1204, 1998.
  - [24] A. A. Like and A. A. Rossini, "Streptozotocin induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus," *Science*, vol. 193, no. 4251, pp. 415–417, 1976.
  - [25] L. F. Barbisan, C. Scolastici, M. Miyamoto, et al., "Effects of crude extracts of *Agaricus blazei* on DNA damage and on rat liver carcinogenesis induced by diethylnitrosamine," *Genetics and Molecular Research*, vol. 2, no. 3, pp. 295–308, 2003.
  - [26] K. Takeuchi, K. Ueshima, T. Ohuchi, and S. Okabe, "Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats," *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 39, no. 3, pp. 626–634, 1994.
  - [27] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
  - [28] J. A. Buege and S. D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation," *Methods in Enzymology*, vol. 52, pp. 302–310, 1978.
  - [29] H. P. Misra and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, no. 10, pp. 3170–3175, 1972.
  - [30] H. Aebi, "Catalase in vitro," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.
  - [31] A. Likidililid, N. Patchanans, S. Poldee, and T. Peerapatdit, "Glutathione and glutathione peroxidase in type 1 diabetic patients," *Journal of the Medical Association of Thailand*, vol. 90, no. 9, pp. 1759–1767, 2007.
  - [32] B. Ribeiro, P. B. Andrade, B. M. Silva, P. Baptista, R. M. Seabra, and P. Valentão, "Comparative study on free amino acid composition of wild edible mushroom species," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, no. 22, pp. 10973–10979, 2008.
  - [33] A. C. De Paula, et al., "Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing beta-glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 38, no. 6, pp. 885–893, 2005.
  - [34] Y. W. Kim, et al., "Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*," *Biotechnology Letters*, vol. 27, no. 7, pp. 483–487, 2005.
  - [35] A. Gumieniczek, H. Hopkała, Z. Wójtowicz, and M. Wysocka, "Changes in antioxidant status of lung tissue in experimental diabetes in rabbits," *Clinical Biochemistry*, vol. 35, no. 2, pp. 147–149, 2002.
  - [36] K. Kida, M. Utsuyama, T. Takizawa, and W. M. Thurlbeck, "Changes in lung morphologic features and elasticity caused by streptozotocin-induced diabetes mellitus in growing rats,"

*American Review of Respiratory Disease*, vol. 128, no. 1, pp. 125–131, 1983.

- [37] D. Popov and M. Simionescu, "Alterations of lung structure in experimental diabetes, and diabetes associated with hyperlipidaemia in hamsters," *European Respiratory Journal*, vol. 10, no. 8, pp. 1850–1858, 1997.
- [38] T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe, and J. W. Baynes, "Chemical modification of proteins by methylglyoxal," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 44, no. 7, pp. 1139–1145, 1998.
- [39] M. D. Rees, E. C. Kennett, J. M. Whitelock, and M. J. Davies, "Oxidative damage to extracellular matrix and its role in human pathologies," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 44, no. 12, pp. 1973–2001, 2008.
- [40] C. Hürdağ, I. Uyaner, E. Gürel, A. Utkusavas, P. Atukeren, and C. Demirci, "The effect of  $\alpha$ -lipoic acid on NOS dispersion in the lung of streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of Diabetes and Its Complications*, vol. 22, no. 1, pp. 56–61, 2008.

## Composition Comments

1. We added the highlighted postal code to the first address. Please check and provide valid postal codes for the second and third addresses as well as a name of a department, divisions or laboratory for the addresses.
2. We completed the frame of Figure 1. Please check.

## Artigo 2

Revista: Jornal Brasileiro de Pneumologia

### AMINO Guanidina Reduz o Estresse Oxidativo e as Alterações Estruturais Pulmonares no Diabetes Mellitus Experimental AMINO Guanidine Reduces Oxidative Stress and Structural Lung Changes in Experimental Diabetes Mellitus

Trabalho submetido em (Article's submission in): 12/3/2010 15:21:24

Instituição (Affiliation): Universidade Federal do Rio Grande do Sul UFRGS

Hospital de Clínicas de Porto Alegre HCPA

Correspondência (Correspondence): Dra Norma Marroni. Rua José Kanan Aranha número 102. Bairro Jardim Isabel. CEP 91760470.

Porto Alegre – RS. Email: nmarroni@terra.com.br



**Jornal Brasileiro  
de Pneumologia**

Brazilian Journal of Pulmonology

**Jornal Brasileiro de Pneumologia**

Secretaria do Jornal Brasileiro de Pneumologia:

SEPS 714/914 - Bloco E - Sala 220/22:

Asa Sul - Brasília/DF - 70390-14:

Fone/Fax: 0800 61 6218, email: jpnemo@jornaldepneumologia.com.br

**Brasília, quinta-feira, 22 de abril de 2010**

**Ilmo(a) Sr.(a)**

**Prof(a), Dr(a) Luiz Alberto Forgiarini Junior**

Referente ao código de fluxo: **2341**

Classificação: **Comunicações Breves**

Temos o prazer de informar que o manuscrito **AMINO Guanidina Reduz o Estresse Oxidativo e as Alterações Estruturais Pulmonares no Diabetes Mellitus Experimental** foi aprovado pelo Conselho Editorial do Jornal Brasileiro de Pneumologia e será publicado em breve. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

#### Comentário do Secretária (Secretary):

Caros Autores:

Ficamos felizes em dizer-lhe que seu artigo intitulado "AMINO Guanidina Reduz o Estresse Oxidativo e as Alterações Estruturais Pulmonares no Diabetes Mellitus Experimental" foi avaliado e aceito para publicação, pelos revisores do Jornal Brasileiro de Pneumologia. A partir de agora para eventuais dúvidas ou questões pendentes, deverão ser encaminhadas para Luana neste e-mail: jpnemo@jornaldepneumologia.com.br, pois é ela quem cuida da parte de publicação. O código de referência deste artigo é 2341/170310/AO. Desde já agradecemos pela sua colaboração com o nosso jornal.

Observação: Não recebemos o copyright. Favor enviar assinado por todos os autores por fax 0800 61 62 18.

Respeitosamente,

Prof. Dr. José Antônio Baddini Martinez

Editor Chefe - Jornal Brasileiro de Pneumologia

Esta é um versão gerada unicamente para visualização dentro do SGP.  
 A versão a ser impressa utilizará outros padrões de formatação.  
 This is a version generated only for visualization inside of SGP.  
 The version to be printed will use other formatting patterns.

### Comunicações Breves

Código de Fluxo: 2341

## AMINO Guanidina Reduz o Estresse Oxidativo e as Alterações Estruturais Pulmonares no Diabetes Mellitus Experimental

### AMINO Guanidine Reduces Oxidative Stress and Structural Lung Changes in Experimental Diabetes Mellitus

#### Autores (Authors)

**Fabio Cangeri Di Naso** : Mestrando, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Fisiologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. - Fisioterapeuta

**Luiz Alberto Forgiarini Junior**: Aluno do Programa de Pós-graduação (Doutorado) em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. - Fisioterapeuta da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Porto Alegre - HPA.

**Luiz Felipe Forgiarini** : Bolsista de Iniciação Científica - Acadêmico do curso de graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Metodista – IPA.

**Marilene Porawski** : Doutora em Fisiologia pela UFRGS. - Professora da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA.

**Alexandre Simões Dias** : Doutorado em Fisiologia pela UFRGS. - Docente no Mestrado Profissional em Reabilitação e Inclusão, Centro Universitário Metodista – IPA.

**Norma Anair Possa Marroni** : PhD em Fisiologia pela UFRGS. - Coordenadora do Laboratório de Hepatologia Experimental e Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS e do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes - Universidade Luterana do Brasil - ULBRA.

#### Descritores (Palavras-chave)

Estresse Oxidativo; Diabetes Mellitus Experimental; Pulmão

#### Keywords

Diabetes Mellitus, Experimental; Oxidative Stress; Lung

#### Resumo

Objetivamos avaliar o efeito da Aminoguanidina sobre o estresse oxidativo pulmonar e a estrutura pulmonar no modelo de diabetes mellitus experimental. Foram avaliados o TBARS, histologia e gasometria arterial em animais diabéticos e controles. Quando analisado o TBARS, observamos um aumento no grupo diabético em relação aos controles e redução no grupo tratado ( $1,62 \pm 0,2$  vs  $2,9 \pm 1,12$  vs  $1,68 \pm 0,04$ ) assim como na  $PO_2$  ( $104,5 \pm 6,3$  vs  $69,48 \pm 16,3$  vs  $97,05 \pm 14,02$ ) e aumento significativo  $PCO_2$  do grupo diabético versus controle ( $49,2 \pm 1,65$  vs  $38,12 \pm 4,85$ ). Concluiu-se que a Aminoguanidina reduz o estresse oxidativo, alterações estruturais teciduais pulmonares e a troca gasosa no modelo experimental.

#### Abstract

We evaluate the effect of aminoguanidine on oxidative stress and pulmonary lung structure in experimental model of diabetes mellitus. TBARS, histology and arterial blood gases were evaluated in diabetic animals and controls. When analyzed the TBARS observed an increase in the diabetic group compared to controls and reduced in the treated group ( $1.62 \pm 0.2$  vs  $2.9 \pm 1.12$  vs  $1.68 \pm 0.04$ ) as well as in  $PO_2$  ( $104,5 \pm 6.3$  vs  $69.48$  vs  $97.05 \pm 14.02$ ), a significant increase in  $PCO_2$  of the diabetic group versus control ( $49.2 \pm 1.65$  vs  $38.12 \pm 4.85$ ). It was concluded that aminoguanidine reduces oxidative stress, structural changes and pulmonary gas exchange tissue in the experimental model.

Trabalho submetido em (Article's submission in): 17/3/2010 15:16:07

Instituição (Affiliation): Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Correspondência (Correspondence): Dra Norma Marroni. Rua José Kanan Aranha número 102. Bairro Jardim Isabel. CEP 91760-470. Porto Alegre – RS. Email: nmarroni@terra.com.br



Suporte Financeiro (Financial support): Fundo de Incentivo a Pesquisa (FIPE) - Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA

Submetido para (Submitted for): Jornal Brasileiro de Pneumologia

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 2341

## **1 Comunicação Breve**

**2**

**3** O diabetes mellitus (DM) é uma desordem metabólica que acomete diversos órgãos e estima-se que 171 milhões de pessoas estejam afetadas pela doença. Este número deverá subir para 366 milhões até o ano de 2030, e os fatores principais que interferem no desenvolvimento da doença é o aumento da idade da população, ao maior número de indivíduos que desenvolve a obesidade, e a maior urbanização das cidades. Atualmente, o DM ocupa o 5<sup>o</sup> lugar nas causas de morte no mundo. (1)

**4** Diversos estudos clínicos e experimentais têm identificado vários mecanismos fisiopatológicos implicados no desenvolvimento das alterações pulmonares induzidas pelo DM, e parece que a inflamação aguda é um dos principais desencadeadores deste processo. (2,3) Distúrbios na produção de surfactante e dificuldade na absorção do edema também estão presentes, bem como o desequilíbrio nas atividades oxidante/antioxidante, coagulação/fibrinólise e no sistema de fibrose/reparação.

**5** Os principais fatores associados às complicações pulmonares crônicas são o estresse oxidativo e a geração de produtos finais de glicosilação avançada (AGEs). (4) Nosso grupo demonstrou que o estresse oxidativo está presente no DM experimental, e os animais que apresentavam a doença possuíam alterações estruturais no tecido pulmonar, bem como

mudança nos valores dos gases sanguíneos. (5)

**6** A utilização de uma terapêutica que bloqueie os AGEs ou reduza o estresse oxidativo e nitrosativo pode ser eficaz na doença pulmonar.

**7** A aminoguanidina (AG - Aminoguanidine hemisulfate salt - Sigma-Aldrich®) previne a formação das AGEs por que contém hidrazina em sua estrutura química, a qual reage com os seguintes compostos: glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglicossina. (6) Além dos efeitos sobre a glicosilação avançada, a aminoguanidina em doses mais baixas pode atuar de maneira específica inibindo a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e reduzir o estresse nitrosativo. (7) A AG também pode inibir o metabolismo da histamina, o catabolismo de poliaminas, a atividade da catalase e potencializar os efeitos da angiotensina na produção de prostaciclina. No entanto, nenhum estudo experimental demonstrou os efeitos da AG sobre as complicações pulmonares decorrentes do DM. (8)

**8** Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da aminoguanidina na redução do estresse oxidativo e dos possíveis danos existentes na estrutura pulmonar provocados pelo DM. Foram realizadas medidas gasométricas sanguíneas para avaliar as alterações existentes na troca gasosa, avaliação do dano oxidativo tecidual e técnicas histológicas para determinar e quantificar as alterações existentes na estrutura pulmonar.

**9** Este é um estudo experimental controlado, no qual foram utilizados ratos da raça Wistar pesando, em média, 300 gramas de peso (g). Todos os animais foram tratados conforme o *Ethical Code for Animal Experimentation* preconizados pela Organização Mundial da Saúde. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (CO), grupo de animais diabéticos (DM) e animais diabéticos que foram tratados com Aminoguanidina (DM AG), e cada grupo foi composto por sete animais. O período do estudo foi de 60 dias, a contar da data em que os animais

diabéticos apresentaram uma glicemia sanguínea superior a 250mg/dL.

**10** O DM foi induzido com uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina (70mg/kg; *Sigma Chemical*, St. Louis, MO, EUA) (9) e a aminoguanidina (*Aminoguanidine hemisulfate salt*, *Sigma Chemical Co*, St Louis, MO-USA) foi utilizada na dose 50 mg/kg de peso corporal (i.p.) durante os últimos 30 dias do experimento. (10)

**11** Para a determinação da glicemia, utilizou-se o teste enzimático colorimétrico, e os animais foram sacrificados no 60º dia de experimento. Todos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xiliasina (50 mg/kg) i.p., para em seguida realizar na região torácica e abdominal uma tricotomia e a laparotomia ventral media. Foi coletado sangue da artéria aorta abdominal no intuito de avaliar os gases arteriais. Foi utilizado um analisador ABL 700 (*Radiometer, Copenhagen, Dinamarca*) para determinar a Pressão Parcial de Oxigênio Arterial ( $PaO_2$ ), a Pressão Parcial de Gás Carbônico ( $PaCO_2$ ) e a Saturação de Oxigênio ( $SaO_2$ ). Posteriormente os pulmões foram retirados e fixados em paraformaldeído a 4% para análise histológica, sendo uma parte armazenada em freezer com temperatura  $-80^\circ C$  para posterior quantificação das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances - TBARS*). A medida das substâncias que reagem ao TBARS foi realizada conforme o estabelecido por Buege e Aust (10).

**12** Para a realização da lipoperoxidação o tecido pulmonar foi homogeneizado (11) e, em seguida, foi realizada a quantificação da proteína segundo o método de Lowry et al. (12)

**13** Para a análise histológica pulmonar foi utilizada a técnica de *Picrosírius Red*. O exame anatomopatológico foi realizado de forma duplo-cega por um patologista do Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Os dados foram analisados no programa *Statistical Package*

for the Social Sciences versão 13 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), sendo utilizado o teste de ANOVA para a comparação entre os grupos, e, como *post-hoc* o teste de *Student-Newman-Keuls* para as comparações entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

**14** Quando analisada a concentração de glicose sanguínea, verificou-se um aumento significativo no grupo diabético quando comparado ao grupo controle, e após o tratamento com AG não houve redução da hiperglicemia. A lipoperoxidação pulmonar foi maior nos animais diabéticos quando comparado ao grupo controle, e a utilização da AG reduziu significativamente os níveis de peroxidação lipídica tecidual, quase retornando aos valores basais. Na análise gasométrica, observamos um aumento na  $\text{PaCO}_2$  no grupo diabético, bem como uma redução na  $\text{PaO}_2$  e  $\text{SaO}_2$  quando comparado aos animais do grupo controle. Entretanto, ao analisarmos os gases sanguíneos dos animais diabéticos tratados com AG houve um aumento significativo na  $\text{PaO}_2$  e na  $\text{SaO}_2$  (Tabela I).

**15**

**16** Tabela I – Comparação entre a glicemia TBARS e gases sanguíneos entre os grupos.

Caso não esteja visualizando a tabela corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sqp/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2341&cod\\_versao=4137&ObiSubmissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sqp/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2341&cod_versao=4137&ObiSubmissao=1)

Parâmetros	Grupo controle (n = 10)	Grupo diabético (n = 10)	Grupo diabético tratado com AG (n = 10)

Glicemia, mg/dL	217,6±11,84	561±35,60*	549,62±42,30**
TBARS, nmols/mgproteína	1,62±0,28	2,90±1,12*	1,68±0,40***
PaO <sub>2</sub> , mmHg	104,58±6,33	69,48±16,30*	97,05±14,02***
PaCO <sub>2</sub> , mmHg	38,12±4,85	49,2±1,65*	45,28±10,84
SaO <sub>2</sub> , %	97,54±0,55	84,92±7,80*	94,6±3,24***

**17** TBARS: *thiobarbituric acid reactive substances* (substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico). AG: aminoguanidina. Valores expressos em média ± dp. \*p<0,05 Grupo diabético vs grupo controle; \*\* p<0,05 Grupo diabético tratado com AG vs grupo controle; \*\*\*p < 0,05 Grupo diabético tratado com AG vs grupo diabético.

**18** Na análise histológica evidenciou-se a presença de células inflamatórias no grupo diabético quando comparado ao grupo controle e também no grupo diabético que recebeu a AG. No grupo diabético também houve aumento na matriz extracelular, a qual determina a presença de fibrose tecidual. Quando quantificada a fibrose, houve aumento significativo no grupo diabético quando comparado ao controle, e, uma redução estatisticamente significativa nos animais diabéticos tratados com AG. (Figura 1)

**19** INSERIR FIGURA 1

**20**

**21** Figura 1 – Fotos de microscopia das amostras de tecido pulmonar: a) controle; b) diabéticos; c) diabéticos tratados com aminoguanidina (*Picrosírius red*, aumento 200x). Gráfico da quantificação da fibrose

(percentual de pixels). \* -  $p < 0,001$  vs controle e diabéticos tratados com AG; # -  $p < 0,001$  vs grupo diabéticos.

22

23 Neste estudo, assim como no estudo realizado anteriormente, observamos aumento na lipoperoxidação do tecido pulmonar em animais diabéticos. (5) No presente estudo a AG reduziu a lipoperoxidação. Apesar de ser uma medida indireta na avaliação do estresse oxidativo, a análise da lipoperoxidação pode indicar dano celular mediado por agentes oxidantes e nitrosantes. Estudos prévios demonstraram a capacidade da aminoguanidina em reduzir a apoptose induzida pelas espécies reativas de oxigênio e pela lipoperoxidação em células da retina e no rim em animais com DM. (14,15)

24 Na gasometria realizada encontramos alterações na troca gasosa nos animais diabéticos, pois houve diminuição na  $PaO_2$  e na  $SO_2$  e aumento na  $PaCO_2$  sanguínea. Resultado semelhante foi encontrado em pacientes diabéticos, pois também há redução significativa na capacidade de difusão pulmonar quando comparados a indivíduos hígidos. Um dos prováveis fatores preditores para esta alteração clínica foi a microalbuminúria apresentada pelos pacientes, pois a mesma demonstrou uma correlação inversa com a difusão pulmonar. (16)

25 Um dos fatores responsáveis por esta alteração no sistema pulmonar pode ter sido o aumento na espessura da membrana basal, já que a mesma pode ser ocasionada pelas ligações inter e intramoleculares com o colágeno, e que são o resultado da ação dos produtos finais da glicosilação avançada (AGEs). Este mecanismo também pode contribuir para aumentar a rigidez e a resistência à digestão proteolítica, bem como interferir nas proteínas da matriz extracelular (fibronectina, colágeno tipo III, IV e VI e laminina) e causar uma *up-regulation* na formação de

citocinas. (17)

**26** A utilização da AG demonstrou ser eficaz no modelo experimental de nefropatia diabética, pois após sua utilização houve redução no espessamento da membrana basal glomerular. (15) No presente estudo a AG melhorou a capacidade difusional dos gases sanguíneos, pois houve aumento na  $PaO_2$  e na  $SaO_2$ . No entanto a  $PaCO_2$  não reduziu após o tratamento. Isto pode ser explicado pelas prováveis alterações existentes na mecânica ventilatória e na ação dos quimiorreceptores centrais e periféricos que também estão afetados no DM.

**27** Quando analisamos a histologia do tecido pulmonar, evidenciamos um aumento Na barreira alvéolo-capilar nos animais diabéticos. Essas alterações também foram observadas por alguns autores (18,19), os quais demonstraram que o DM é o principal responsável por alterações estruturais pulmonares. Segundo estudo de Eren et. al., que avaliou a inibição do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF-kB) em modelo experimental de DM, fica demonstrado que o pulmão de animais diabéticos apresenta alterações na estrutura tecidual, e que este foi ocasionado pelo aumento do estresse oxidativo, e quando o NF-kB foi inibido houve redução na injúria pulmonar induzida pela doença. (20)

**28** A aminoguanidina possivelmente atua como um inibidor dos produtos finais da glicosilação avançada, pois reduz os níveis de estresse oxidativo pulmonar e diminui as alterações estruturais pulmonares causadas pelo aumento na síntese e na deposição de colágeno.

**29** Concluímos que há alterações estruturais no tecido pulmonar de animais diabéticos, ocasionando modificações nas trocas gasosas bem como um aumento do estresse oxidativo. Após a utilização da aminoguanidina observou-se uma redução na lipoperoxidação e redução nas alterações estruturais pulmonares expressa através da fibrose, bem

como o restabelecimento da PaO<sub>2</sub> e da SaO<sub>2</sub>.

### **30 Referências Bibliográficas**

- 31** 1. Diabetes Prevention Program Research Group. 10-year follow-up of diabetes incidence and weight loss in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study. *Lancet* 2009;374:1677-86.
2. Gumieniczek A, Wilk M. Nitrosative stress and glutathione redox system in different tissue of alloxan-induced hyperglycemic animals. *Toxicol Mech Methods* 2009;19(4):302-307.
3. Foster DJ, Ravikumar P, Belloto DJ, Unger RH, Hsia CC. Fatty diabetic lung: altered alveolar structure and surfactant protein expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010 *In press*.
4. Honiden S, Gong MN. Diabetes, insulin and development of acute lung injury. *Crit Care Med* 2009;37:2455-2464.
5. Forgiarini Jr LA, Kretzmann NA, Porawski M, Dias AS, Marroni NA. Experimental diabetes mellitus: oxidative stress and changes in lung structure. *J Bras Pneumol* 2009;35(8):788-91.
6. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation end products. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):31-40.
7. Szabo, C., Ferrer-Sueta, G., Zingarelli, B., Southan, G.J., Salzman, A.L. & Radi, R. Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* 1997: 272, 9030-9036.



8. Nilsson, B.O. Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflamm Res.*1999; 48, 509-515.
9. Dias AS, Porawski M, Alonso M, Marroni N, Collado PS, Gonzalez-Gallego J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-B Activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* 2005;135: 2299–2304.
10. Degenhardt TP, Fu MX, Voss E, Reiff K, Neidlein R, Strein K, et al. Aminoguanidine inhibits albuminuria, but not the formation of advanced glycation end-products in skin collagen of diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999;43(2):81-9.
11. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4-epiadriamycin in mice. *Tumori.* 1985;71(3):241-9.
12. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52:302-10.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
14. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes.* 1998; 47(7):1114-20.
15. Kelly DJ, Gilbert RE, Cox AJ, Soulis T, Jerums G, Cooper ME. Aminoguanidine ameliorates overexpression of pro-sclerotic growth factors and collagen deposition in experimental diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(10):2098-107.

16. Saler T, Cakmak G, Saglam ZA, Ataoglu E, Yesim T, Yenigun M. The assessment of pulmonary diffusing capacity in diabetes mellitus with regard to microalbuminuria. *Inttern Med* 2009; 48(22):1939-43.
17. Goh SY, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(4):1143-52.
18. Popov D, Simionescu M. Alterations of lung structure in experimental diabetes, and diabetes associated with hyperlipidaemia in hamsters. *Eur Respir J.* 1997; 10(8):1850-8.
19. Watanabe K, Senju S, Toyoshima H, Yoshida M. Thickness of the basement membrane of bronchial epithelial cells in lung diseases as determined by transbronchial biopsy. *Respir Med.* 1997; 91(7):406-10.
20. Eren G, Cukurova Z, Hergunsel O, Demir G, Kucur M, Uslu E, Dalo E, Uhri M, Tugcu V. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in lung injury in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Respiration* 2009 *In press.*

**Imagens enviadas pelo autor. (Images sent by the author)**

Caso não esteja visualizando a imagem corretamente acesse a versão online clicando no link a seguir:

[http://www.jornaldepneumologia.com.br/sgp/detalhe\\_simples.asp?cod\\_fluxo=2341&cod\\_versao=4137&ObjSubmissao=1](http://www.jornaldepneumologia.com.br/sgp/detalhe_simples.asp?cod_fluxo=2341&cod_versao=4137&ObjSubmissao=1)

