

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SANGUE,  
FÍGADO E RINS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM  
CURCUMINA E/OU INSULINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Heloisa Einloft Palma**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SANGUE,  
FÍGADO E RINS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM  
CURCUMINA E/OU INSULINA**

**Heloisa Einloft Palma**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cinthia Melazzo A. Mazzanti**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SANGUE, FÍGADO E  
RINS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA E/OU  
INSULINA**

elaborada por  
**Heloisa Einloft Palma**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**Comissão Examinadora:**

---

**Cynthia Melazzo A. Mazzanti, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Roselia Maria Spanevello, Dr<sup>a</sup>. (UFPel)**

---

**Roberta Schmatz, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 01 de março de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Cinthia Melazzo Mazzanti pela confiança depositada durante todo o mestrado, pelas palavras de apoio e incentivo, pelos ensinamentos e pela amizade;

À Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes pela co-orientação e auxílio neste trabalho e, especialmente à confiança e oportunidade de fazer parte da equipe do Lacvet;

A toda a equipe do Laboratório de Análises Clínicas Veterinária, pela amizade e apoio durante o mestrado, principalmente à Patrícia Wolkmer que foi, e ainda é, fundamental para meu desenvolvimento como pós-graduanda, às minhas estagiárias queridas e “mimosas” Bianca Cecco, Débora Rosolen e Thaís Mann que tiveram extremo cuidado e carinho no desenvolvimento desse trabalho e ao médico veterinário especialista em Patologia Clínica Marcos Matoso Burgo Corrêa, pelos momentos de descontração e carinho;

A todos do Laboratório de Bioquímica Toxicológica pela ajuda e, em especial, à Dr<sup>a</sup> Roberta Schmatz pelo grande auxílio na indução do diabetes *mellitus* e nas dosagens enzimáticas das amostras;

A CAPES, por possibilitar a execução deste trabalho por meio da bolsa a mim concedida, permitindo minha total dedicação ao Curso de Pós-Graduação;

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, por permitir a realização de mais uma etapa de minha vida profissional, em especial à secretária do curso, Maria, pela atenção dispensada a mim em todos os momentos necessários;

Agradeço especialmente meus pais, Valter Melo Castillo Palma e Gladis Einloft Palma, pelo amor incondicional e que sempre entenderam, respeitaram e incentivaram a minha escolha em aprimorar meus estudos e minhas qualificações, buscando meus ideais;

Agradeço também meu noivo, Miguel Gallio, por estar comigo em todos os momentos dessa etapa de nossas vidas, por me dar conselhos tanto em relação aos estudos como palavras de amor e carinho, despendendo toda sua dedicação e paciência a mim;

Por fim, gostaria de agradecer a todos os animais que participaram desse estudo e deram a vida para que novos estudos pudessem ser realizados.

*“A man is relieved and gay when he has put  
his heart into his work and done his best.”*

Ralph Waldo Emerson

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO NO SANGUE, FÍGADO E RINS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CURCUMINA E/OU INSULINA**

AUTORA: HELOISA EINLOFT PALMA  
ORIENTADORA: CINTHIA MELAZZO A. MAZZANTI

Santa Maria, 01 de Março de 2013.

O diabetes *mellitus* (DM) é um importante problema de saúde que afeta a população humana e é comumente observada na clínica de pequenos animais. Diversos estudos relatam que a hiperglicemia é a principal causa das complicações do DM, tais como catarata, nefropatia e neuropatia. A hiperglicemia causa a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumenta o dano oxidativo de lipídios, DNA e proteínas em diversos tecidos. O estresse oxidativo está aumentado nas células como resultado da depleção de enzimas antioxidantes, especialmente a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) removedoras de EROs. A curcumina é o principal componente da *Curcuma longa* e tem sido usada tradicionalmente como antidiabético e há evidências científicas que esse composto apresenta uma alta atividade antioxidante. Considerando que a dieta faz parte do tratamento do paciente diabético e que a curcumina é um agente antioxidante, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos desse composto, associado ou não à insulino terapia, sobre os parâmetros de estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Em adição, também foi avaliada a histopatologia do fígado e rim dos ratos sadios e diabéticos tratados com estes compostos. Para isso, os ratos foram distribuídos em seis grupos, cada um com seis animais: grupo controle (C), grupo controle curcumina (CCur), grupo diabético (D), grupo diabético curcumina (DCur), grupo diabético insulina (DIns) e grupo diabético insulina e curcumina (DInsCur). A curcumina foi diluída em óleo de milho e administrada na dose de 60mg/kg, uma vez ao dia e a insulina aplicada a cada 12 horas nas doses de 1,5UI/rato pela manhã e 2,5UI/rato à tarde por um período de 30 dias. Nos grupos D e DCur, a análise histológica do fígado mostrou número elevado de hepatócitos binucleados e alterações nas trabéculas. Nos rins, havia vacuolização das células tubulares, congestão glomerular e focos inflamatórios mononucleares. O tratamento com insulina reduziu as lesões renais e hepáticas dos grupos DIns e DInsCur. Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) apresentaram-se elevados no soro dos grupos D e DInsCur e nos tecidos hepático e renal do grupo D ( $P<0,05$ ). A atividade da CAT foi baixa no fígado e rins dos grupos D, DIns and DCur; também houve um aumento significativo na atividade desta enzima nos rins do grupo DInsCur. Já no sangue, a atividade da CAT foi alta nos grupos D e DInsCur ( $P<0,05$ ). A atividade da SOD no sangue estava reduzida nos grupos D e DInsCur e aumentada nos grupos DIns e DCur ( $P<0,05$ ), já no fígado, a atividade da SOD estava aumentada nos grupos D e DInsCur. A atividade da enzima delta-aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D) estava reduzida no fígado e rins do grupo D e o tratamento com insulina e/ou curcumina preveniu a redução da sua atividade no tecido hepático dos grupos DIns, DInsCur e DCur e no tecido renal dos grupos DCur e DInsCur. Dessa forma, observa-se que o tratamento com curcumina ou insulina preveniu o estresse oxidativo no sangue dos ratos diabéticos, através da modulação das defesas antioxidantes enzimáticas. Em relação à peroxidação lipídica, ambas substâncias apresentaram efeito benéfico no soro, fígado e rins, com exceção do soro do grupo DInsCur, revelando um efeito negativo quando a curcumina e a insulina foram associadas. Com esta investigação, foi possível demonstrar a importância do uso da insulina como tratamento de eleição do DM, visto que este fármaco foi capaz de prevenir danos celulares nos órgãos avaliados histologicamente. Além disso, este estudo contribuiu para a compreensão de que antioxidantes provenientes de plantas medicinais, como a curcumina, podem ser utilizados como adjuvantes no tratamento desta endocrinopatia e não como terapia isolada.

**Palavras-chave:** Diabetes *mellitus*. Catalase. Superóxido dismutase. Peroxidação lipídica. Insulina. Curcumina.  $\delta$ -ALA-D.

# ABSTRACT

Master's Dissertation  
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine  
Federal University of Santa Maria

## OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN BLOOD, LIVER AND KIDNEY OF DIABETIC RATS TREATED WITH CURCUMIN AND / OR INSULIN

AUTHOR: HELOISA EINLOFT PALMA  
ADVISER: CINTHIA MELAZZO A. MAZZANTI  
Santa Maria, March 01<sup>st</sup> 2013

Diabetes *mellitus* (DM) is an important health problem that affects worldwide human population and is commonly observed in small animal clinics. Many studies show that hyperglycemia is the pivotal cause of DM complications, including cataract, nephropathy and neuropathy. Hyperglycemia leads to generation of reactive oxygen species (ROS) and increases oxidative damage of lipids, DNA and proteins in many tissues. Oxidative stress is increased in cells in response to a depletion of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) that scavenge oxygen reactive species. Curcumin is the main component of *Curcuma longa* and has been used traditionally as an antidiabetic agent; and there are evidences that this substance presents high activity of ROS scavenger. Considering that diet is part of diabetic state treatment and that curcumin is considered an antioxidant agent, this study aimed to evaluate the effects of curcumin and/or insulin on oxidative stress parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. In addition, it was performed a histopathological analysis of the liver and kidney of healthy and diabetic rats treated with these compounds. For this, the animals were divided into six groups, with six animals each: Control (C); Control/Curcumin (CCur); Diabetic/Saline (D); Diabetic/Insulin (DIns); Diabetic/Curcumin (DCur), and Diabetic/Insulin/Curcumin (DInsCur). Curcumin was diluted in corn oil and administered at the dosage of 60mg/kg once a day and insulin was administered twice a day, at the dosage of 1.5IU/rat in the morning and 2.5IU/rat in the afternoon, for a period of 30 days. In groups D and DCur, the histological analysis of the liver revealed elevated number of binucleated hepatocytes and alterations in hepatic trabeculae. In kidney there were vacuolization of tubular cells, glomerular congestion and mononuclear inflammatory focus. The treatment with insulin ameliorate renal and hepatic lesions from both DIns and DInsCur groups. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels were increased in serum of D and DInsCur groups and in hepatic and renal tissue of group D ( $P<0.05$ ). CAT activity was low in liver and kidney of groups D, DIns and DCur; there was significant increase in kidney of DInsCur group; in blood, catalase activity was high in groups D and DInsCur ( $P<0.05$ ). SOD activity in blood was decreased in groups D and DInsCur and increased in groups DIns and DCur ( $P<0.05$ ). In liver, SOD activity was increased in groups D and DInsCur. Delta aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity was reduced in liver and kidney of group D and treatment with insulin and/or curcumin prevented the decrease of the activity in hepatic tissue from groups DIns, DInsCur and DCur, and renal tissue from groups DCur and DInsCur. Thus, treatments with curcumin or insulin prevented oxidative stress in blood of diabetic rats, through modulation of antioxidant defenses. Regarding lipid peroxidation, both substances presented positive effect in serum, liver and kidney, except in serum from group DInsCur, revealing a negative effect when curcumin and insulin were associated. With this experiment, it was possible to



demonstrate the importance of insulin as primary treatment of DM, once this drug prevented cell damage in organs analyzed by histopathology. Furthermore, this study contributed to comprehend that antioxidants from medicinal plants, such as curcumin, can be used as adjuvant in treatment of this endocrinopathy and not as a single therapy.

**Keywords:** Diabetes *mellitus*. Catalase. Superoxide dismutase. Lipid peroxidation. Insulin. Curcumin.  $\delta$ -ALA-D.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hiperglicemia intracelular gerando radical superóxido ( $O_2^{\cdot}$ ) na mitocôndria, seguida de ativação das vias envolvidas na patogênese do diabetes <i>mellitus</i> .....	19
Figura 2 – Redução do oxigênio ( $O_2$ ) até água ( $H_2O$ ) que ocorre na mitocôndria, gerando diversas espécies reativas de oxigênio.....	20
Figura 3 – Esquema ilustrativo demonstrando os alvos das espécies reativas de oxigênio (EROs): as proteínas, os lipídios e o DNA.....	21
Figura 4 – Sistema antioxidante enzimático, representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).....	23
Figura 5 – Isolamento, extração e componentes da curcuma.....	24
Figura 6 – Estrutura química da curcumina.....	25

## CAPÍTULO I

Figure 1 - Normal histological aspect of the liver, hemotoxylin & eosin, (A) control and (B) control/curcumin. 30 days after DM induction with STZ it was observed disaggregation of trabeculae in diabetic rats (C) (arrow head). Treatment with insulin (D) and insulin associated with curcumin (F) reverted the hepatic damage caused by diabetic state. Curcumin <i>per se</i> (E) was not able to prevent trabeculae disaggregation in diabetic rats (arrow head). Curcumin dose: 60mg/kg. Obj.40x...55	55
Figure 2 - Normal histological aspect of the kidney, hemotoxylin & eosin, (A) control and (B) control/curcumin. 30 days after DM induction with STZ it was observed vacuolization of tubular cells in diabetic rats (C) (arrow head). Treatment with insulin (D) and insulin associated with curcumin (F) reverted the renal damage caused by diabetic state. Curcumin <i>per se</i> (E) was not able to prevent vacuolization of tubular cells in diabetic rats (arrow head). Curcumin dose: 60mg/kg. Obj. 40x.56	56
Figure 3 - Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means $\pm$ S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.....	57
Figure 4 - CAT activity in blood (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means $\pm$ S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.....	58
Figure 5 - SOD activity in blood (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means $\pm$ S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.....	59
Figure 6 - $\delta$ -ALA-D activity in liver (A) and kidney (B) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means $\pm$ S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ; $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.....	60

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Table 1 – Body weight and blood glucose levels in control and STZ-induced diabetic rats treated with curcumin 60mg/kg and/or insulin at the onset of the experiment....	61
Table 2 – Hepatic and renal markers of STZ-induced diabetic rats treated with curcumin 60mg/kg and/or insulin.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**$\delta$ -ALA-D** –Delta-aminolevulinato ácido desidratase

**$\delta$ -ALA** – Ácido delta-aminolevulínico

**CAT** – Catalase

**DM** – Diabetes *mellitus*

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**SOD** – Superóxido dismutase

**STZ** – Estreptozotocina

**TBARS** – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 CAPÍTULO I</b> .....	<b>27</b>
<b>MANUSCRITO</b> .....	<b>28</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>29</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>30</b>
<b>MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>32</b>
<b>Reagents</b> .....	<b>32</b>
<b>Animals</b> .....	<b>32</b>
<b>Diabetes mellitus type 1 induction</b> .....	<b>33</b>
<b>Experimental design and curcumin treatment</b> .....	<b>33</b>
<b>Collection and preparation of blood samples</b> .....	<b>34</b>
<b>Histological studies</b> .....	<b>34</b>
<b>Lipid peroxidation</b> .....	<b>34</b>
<b>Enzyme assay</b> .....	<b>35</b>
Catalase (CAT) activity .....	<b>35</b>
Superoxide dismutase (SOD) activity.....	<b>35</b>
$\delta$ -ALA-D activity.....	<b>35</b>
<b>Biochemical analysis</b> .....	<b>35</b>
Protein determination.....	<b>36</b>
Statistical analysis.....	<b>36</b>
<b>RESULTS</b> .....	<b>36</b>
<b>Blood glucose and body weight</b> .....	<b>36</b>
<b>Histological findings</b> .....	<b>36</b>
<b>Lipid peroxidation</b> .....	<b>37</b>
<b>Catalase (CAT) activity</b> .....	<b>37</b>
<b>Superoxide dismutase (SOD) activity</b> .....	<b>38</b>
<b><math>\delta</math>-ALA-D activity</b> .....	<b>38</b>
<b>Biochemical analysis</b> .....	<b>39</b>
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>47</b>
<b>REFERENCES</b> .....	<b>48</b>
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>4 PERSPECTIVAS</b> .....	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, e se encontram no item “Manuscrito”. As seções “Materiais e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” encontram-se no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item “Conclusões”, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens “Introdução” desta dissertação.

# 1 INTRODUÇÃO

O diabetes *mellitus* (DM) é uma doença caracterizada pela deficiência absoluta ou relativa de insulina, e está se tornando a epidemia do século, uma vez que afeta cerca de 246 milhões de pessoas em todo o mundo. Estima-se que boa parte das pessoas que têm diabetes desconhece a sua própria condição (Ministério da Saúde, 2012).

O DM é uma desordem metabólica de carboidratos, gorduras e proteínas caracterizada por insuficiência de secreção da insulina endógena pelo pâncreas ou incapacidade de ação desse hormônio nos tecidos alvo, resultando em hiperglicemia (MARITIM et al., 2003; ADA, 2011).

A *American Diabetes Association* (ADA, 2012), subdivide o DM em quatro classes clínicas, classificadas em:

- DM Tipo 1 (DM1): resultante da destruição das células  $\beta$  pancreáticas, levando a deficiência absoluta de insulina;
- DM Tipo 2 (DM2): resultante de um defeito progressivo na secreção de insulina associado à resistência insulínica;
- Outros tipos de diabetes devido a diversas causas, tais como: defeitos genéticos no funcionamento das células  $\beta$ , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino e DM induzido por drogas ou químicos;
- DM gestacional, diagnosticada durante a gravidez.

As formas de DM de ocorrência mais frequente são os tipos 1 e 2 (GROSS et al., 2002).

O DM1 (antigamente denominado diabetes *mellitus* dependente de insulina) corresponde a apenas 5-10% do total de casos da doença, entretanto, esse tipo de DM representa uma preocupação significativa de saúde, uma vez que essa desordem comumente se desenvolve em pessoas com menos de 30 anos de idade (ADA, 1993; DANEMAN, 2006).

O DM1 resulta de uma interação entre fatores genéticos, ambientais e autoimunes que levam a destruição das células  $\beta$  pancreáticas produtoras de insulina (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a), levando a uma deficiência absoluta desse hormônio. Essa destruição ocorre mais comumente como resultado de um processo autoimune, sendo, dessa forma, caracterizada como DM tipo 1A ou, menos comumente, por causa desconhecida, sendo dessa maneira referida como DM idiopática ou DM tipo 1B (IMAGAWA et al., 2000; ADA, 2012).

A susceptibilidade ao DM1 é hereditária e o principal gene associado com a predisposição à doença é o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no cromossomo 6, na região associada aos genes de reconhecimento de moléculas polimórficas conhecida como *human leucocyte antigen* (HLA). A classe I de moléculas HLA apresenta os antígenos peptídicos aos linfócitos T CD8 e a classe II aos linfócitos T CD4, e esse processo é a base da resposta imune (ATKINSON & MACLAREN, 1994).

Esta ativação anormal do sistema imune mediada por células T em indivíduos suscetíveis leva a um processo de insulite, que é caracterizada pela infiltração de células mononucleares nas ilhotas pancreáticas. Este é o resultado direto do processo autoimune, levando a destruição seletiva das células  $\beta$  pancreáticas, o que leva à perda da secreção de insulina (BONNER-WEIR, 2000), bem como a uma resposta humoral por células B, com a produção de anticorpos contra antígenos das células  $\beta$  (DANEMAN, 2006). De uma forma geral, a instalação do quadro de diabetes tipo 1A é relativamente abrupta (IMAGAWA et al., 2000; GROSS et al., 2002). Já a forma idiopática do DM1, o tipo 1B, é caracterizada pela ausência de insulite e dos anticorpos relacionados ao diabetes autoimune e seu desenvolvimento é rápido, com cetoacidose ocorrendo logo após o início dos sinais clínicos de hiperglicemia (IMAGAWA et al., 2000).

O DM2, previamente conhecido como diabetes *mellitus* não dependente de insulina, é resultante de um defeito progressivo na secreção de insulina associado à resistência insulínica (ADA, 2012). Esse tipo da doença é a forma mais comum de DM, correspondendo a mais de 80% dos casos no mundo. Embora se tenha verificado recentemente que o DM2 é encontrado com frequência cada vez maior em crianças, adolescentes e adultos jovens, em geral está associado ao avanço da idade; a maioria dos casos é diagnosticada após os 45 anos (INZUCCHI & SHERWIN, 2010b). Sua incidência está aumentando dramaticamente como resultado das alterações comportamentais do ser humano, bem como um estilo de vida sedentário associado à falta de atividade física e obesidade (LAAKSO, 2001; INZUCCHI & SHERWIN, 2010b; HU, 2011).

Em contraste com o DM1, o DM2 é caracterizado por resistência insulínica com significativas disfunções metabólicas que incluem obesidade, redução da função e secreção de insulina e aumento na liberação de glicose endógena. Deve-se notar que, embora a resistência insulínica seja a base do desenvolvimento do DM2, os níveis de glicose séricos aumentados também resultam de um impedimento na secreção da insulina (ADA, 1993; MAIESE et al., 2007).



O DM é uma desordem acompanhada por complicações tardias características, que incluem retinopatia, nefropatia e neuropatia, sendo que todos os tipos da doença predisõem a essas complicações. A cetoacidose diabética e a síndrome hiperglicêmica hiperosmolar também são consideradas complicações do DM, e a hipoglicemia uma complicação de seu tratamento (NATHAN, 1993).

A hiperglicemia se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida, como a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica (GROSS et al., 2002; ADA, 2011). A longo prazo, o diabetes pode apresentar complicações microvasculares e macrovasculares, que estão relacionadas com as altas taxas de morbidade e mortalidade (DANEMAN, 2006). As complicações microvasculares do DM incluem retinopatia com possível perda de visão, nefropatia que pode resultar em insuficiência renal e neuropatia, que pode levar ao desenvolvimento de úlceras nos pés e amputações. Como complicações macrovasculares, os diabéticos apresentam incidência aumentada de aterosclerose e doenças cardiovasculares (ADA, 2011). A doença renal terminal da nefropatia diabética constitui uma importante causa de morbidade e mortalidade, particularmente em pacientes com DM1, dos quais 30 a 35% estão suscetíveis a esta complicação (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a).

Um estudo feito com 173.643 pacientes diabéticos indicou a relação entre diabetes e doença hepática (EL-SERAG et al., 2004). A pesquisa demonstrou que a incidência de doença crônica e de câncer de fígado foi aproximadamente o dobro comparado aos pacientes não diabéticos. A hepatopatia associada com o diabetes é usualmente insidiosa, assintomática e não é detectada até que uma condição grave, tal como câncer ou insuficiência hepática ocorra.

O diagnóstico do DM deve ser feito precocemente já que mudanças no estilo de vida e a correção da hiperglicemia podem retardar o aparecimento do diabetes ou de suas complicações (GROSS et al., 2002). O DM2 dificilmente é diagnosticado até que as complicações se estabeleçam, já os pacientes com DM1 apresentam-se com sintomas agudos de DM e níveis glicêmicos marcadamente elevados, e a maioria dos casos é diagnosticada logo após o aparecimento da hiperglicemia (ADA, 2012).

A *American Diabetes Association* (ADA, 2012) recomenda a mensuração da hemoglobina A<sub>1C</sub> (hemoglobina glicada ou hemoglobina glicosilada) para o diagnóstico do DM, que é confirmado quando seus níveis forem  $\geq 6,5\%$ . Esse é considerado o método de referência para avaliação do grau de controle glicêmico a longo prazo (GROSS et al., 2002).

Entretanto, o diagnóstico dessa doença baseia-se fundamentalmente nas alterações da glicose plasmática de jejum ou após uma sobrecarga de glicose por via oral. O teste oral de

tolerância à glicose (TOTG) é o método de referência, considerando-se a presença de diabetes ou tolerância à glicose diminuída quando a glicose plasmática de duas horas após a ingestão de 75g de glicose anidra for  $\geq 200\text{mg/dL}$  ou  $\geq 140\text{mg/dL}$  e  $< 200\text{mg/dL}$ , respectivamente. Quando este teste não puder ser realizado, utiliza-se a medida da glicose plasmática em jejum, considerando-se como diabetes ou glicose alterada em jejum quando os valores forem  $\geq 126\text{mg/dL}$  ou  $\geq 110\text{mg/dL}$  e  $< 126\text{mg/dL}$ , respectivamente (GROSS et al., 2002). A confirmação por esses métodos não é necessária em um paciente que apresente sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica e com níveis de glicose plasmática  $\geq 200\text{mg/dL}$  (ADA, 2012; GROSS et al., 2002).

O DM é uma doença crônica que requer cuidado médico contínuo e educação do paciente em relação ao controle da doença e suporte para a prevenção das complicações agudas e para reduzir o risco de complicações tardias. A hiperglicemia define o DM, logo, o controle glicêmico é fundamental no manejo dessa doença (ADA, 2012). Indivíduos com DM1 precisam ter um manejo terapêutico que objetive reduzir ao máximo os riscos de hipoglicemia e cetoacidose diabética a curto prazo e, a longo prazo, as complicações micro e macrovasculares (DANEMAN, 2006). O foco primário é a reposição da secreção de insulina que foi perdida. Um estilo de vida saudável também é exigido para facilitar a terapia insulínica e otimizar a saúde (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a).

Uma variedade de preparados insulínicos altamente purificados está comercialmente disponível. O mesmo preparado insulínico pode produzir respostas variadas em um único paciente, uma vez que o pico e a duração da maior parte dos preparados insulínicos são influenciados pelo local da administração e pela magnitude da dose de insulina (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a). Os preparados insulínicos de ação prolongada foram modificados para retardar sua absorção a partir dos locais de injeção, resultando em duração mais prolongada da atividade insulínica. A adição da protamina e do zinco produziu a insulina neutra protamina Hagedorn (NPH). Essa insulina de ação intermediária pode ser administrada duas vezes ao dia e oferece um meio-termo entre algum grau de cobertura das refeições (coincidindo com o pico de atividade) e a provisão de níveis insulínicos basais (INZUCCHI & SHERWIN, 2010a).

Como no caso dos indivíduos com DM1, os objetivos primários a longo prazo dos pacientes de DM2 são minimizar as complicações e preservar o bem-estar clínico do paciente. Em muitos pacientes, dieta e exercício são as únicas intervenções terapêuticas necessárias para restaurar o controle metabólico. Os agentes orais são indicados em pacientes nos quais a dieta e o exercício não conseguem atingir os objetivos do tratamento. Os pacientes com

hiperglicemia mais grave podem necessitar insulina durante as fases iniciais de tratamento depois de estabilizados os níveis de glicose e minimizados os efeitos “tóxicos” da hiperglicemia grave sobre a ação das células  $\beta$ , muitos desses pacientes podem então passar aos agentes orais (INZUCCHI & SHERWIN, 2010b).

No Brasil, de acordo com o VIGITEL (2011) (Sistema de Monitoramento de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas Não Transmissíveis), a ocorrência média de diabetes na população adulta (acima de 18 anos) é de 5,6%. Dados do Sistema Único de Saúde mostram que o DM é a sexta causa primária de internações no Brasil, e contribui em até 50% para outros fatores causais de internação, como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial. O DM no Brasil ainda é a principal causa de amputações de membros inferiores, de cegueira adquirida e de insuficiência renal dialítica (INZUCCHI & SHERWIN, 2010b).

Na medicina veterinária, especialmente na área de pequenos animais, o DM é uma endocrinopatia comumente diagnosticada. As formas mais comuns de DM em animais de companhia variam conforme a espécie, sendo o DM tipo 1 mais observado em cães, enquanto o DM tipo 2 é a forma mais comum em gatos (RAND et al., 2004).

Os cães e gatos adquiriram hábitos de vida semelhantes aos humanos predispostos ao DM, uma vez que evoluíram de caçadores para animais que moram em casas ou apartamentos e não mais dependem da caça para suprirem suas necessidades nutricionais. Nos gatos, a obesidade é responsável pela resistência a insulina, predispondo-os à DM2. Já nos cães, não há relatos que demonstrem que a obesidade seja um fator de risco para a ocorrência de DM2 nesses animais. Assim, o DM1 é a forma mais comumente observada nessa espécie, sendo que pelo menos 50% dos cães diabéticos apresentam destruição imunomediada das células  $\beta$  pancreáticas que levam à deficiência absoluta de insulina (RAND et al., 2004).

O crescente aumento de casos de diabetes e suas conseqüências catastróficas para a população humana e animal tem estimulado diversas pesquisas nessa área da endocrinologia.

A estreptozotocina (STZ) é um antibiótico que causa a destruição seletiva das células  $\beta$  pancreáticas, sendo dessa forma, amplamente utilizada experimentalmente como um agente capaz de induzir DM1 em ratos, constituindo um modelo animal bem estabelecido (MARITIM et al., 2003; WU & HUAN, 2008). O efeito diabetogênico dessa droga está relacionado com a toxicidade e morte das células pancreáticas causada pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a uma deficiência da produção de insulina no DM (WU & HUAN, 2008; AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009).

Embora o DM1 e o DM2 tenham diferentes etiologias, ambos apresentam em comum a ocorrência de hiperglicemia (NDISANG & JADHAN, 2009), e diversos estudos sugerem que esse seja o principal fator responsável pela produção aumentada de EROs nas mitocôndrias das células alvo do DM.

A hiperglicemia associada a produção de EROs é o mecanismo que desencadeia a ativação de uma diversidade de vias (Figura 1) que resultam em aumento da formação intracelular de produtos finais da glicação avançada (AGEs), ativação da proteína C quinase, ativação da via dos poliois e do fluxo da via da hexosamina (BROWNLEE, 2005; REIS et al., 2008; INZUCCHI & SHERWIN, 2010a), que contribuem para o desenvolvimento das complicações diabéticas, incluindo a hepatotoxicidade (HAMDEN et al., 2009) e a nefropatia diabética (BARBOSA et al., 2008).

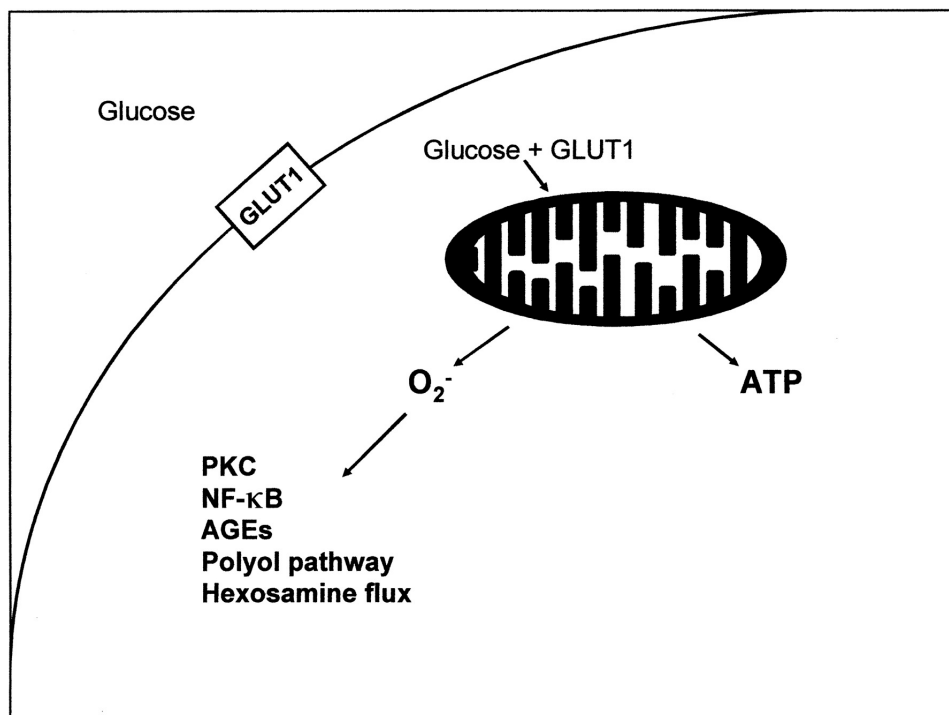


Figura 1 – Hiperglicemia intracelular gerando radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) na mitocôndria, seguida de ativação das vias envolvidas na patogênese do diabetes *mellitus*. Fonte: CERIELLO (2003).

Os radicais livres são átomos, íons ou moléculas altamente instáveis e reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica e tendem a ligar esse elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; REIS et al., 2008). Como a maioria dos radicais livres

são derivados do metabolismo do oxigênio, usa-se o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) para denominá-los (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). A produção excessiva de EROs associada ou não a uma proteção antioxidante inadequada gera a condição conhecida como estresse oxidativo (BRITO et al., 2007).

Os produtos de redução do oxigênio que são formados na reação autooxidativa da glicose são os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxiperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), sendo que todos podem causar danos a lipídios e proteínas (GIUGLIANO et al., 1996; FERREIRA & MATSUBARA, 1997) (Figura 2).

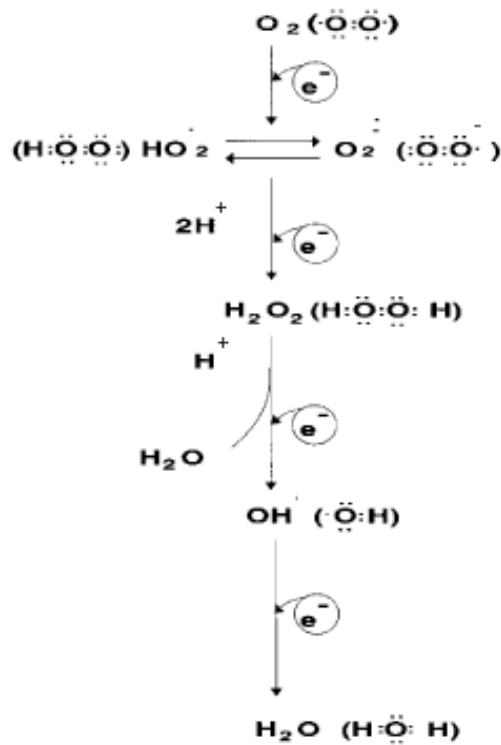


FIGURA 2 – Redução do oxigênio ( $O_2$ ) até água ( $H_2O$ ) que ocorre na mitocôndria, gerando diversas espécies reativas de oxigênio. Fonte: FERREIRA & MATSUBARA (1997).

O radical superóxido é formado após a primeira redução do oxigênio, e mesmo sendo considerado o menos reativo, pode causar lesão. O radical hidroxiperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas. Já o radical hidroxila é considerado a ERO mais reativa em sistemas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Apesar de não ser um radical livre, o  $H_2O_2$  é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação de Fenton que produz  $OH^{\cdot}$ , sendo

capaz de atravessar as camadas lipídicas de membranas e reagir com proteínas ligadas ao ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

O dano oxidativo às macromoléculas biologicamente importantes pode levar a inativação ou mutação da cadeia de DNA, inativação proteica e oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, resultando na formação de peróxidos de lipídios (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) (Figura 3).

O radical hidroxila é frequentemente reconhecido como a espécie iniciadora e a mais importante da lipoperoxidação. A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos, o que acarreta em alterações em sua estrutura e permeabilidade, ocorrendo perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos como o malondialdeído, fatores estes que culminam em morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

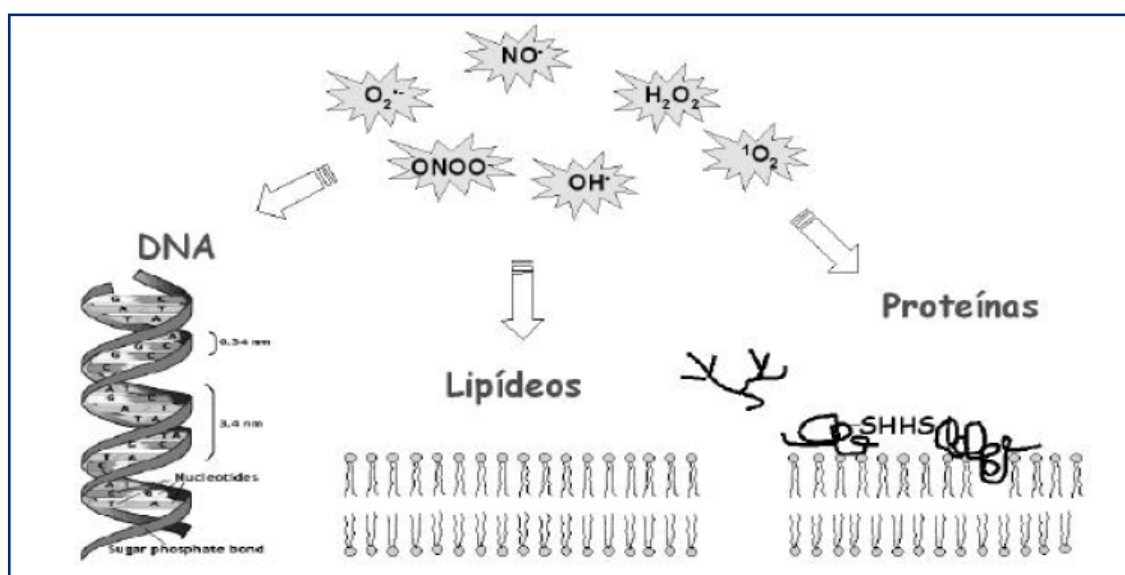


Figura 3 – Esquema ilustrativo demonstrando os alvos das espécies reativas de oxigênio (EROs): as proteínas, os lipídios e o DNA. Fonte: TORRES et al., 2003.

O estresse oxidativo também parece ser um importante fator que contribui com a alteração na atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D (E.C. 4.2.1.24) (SOUZA et al., 2007). Essa enzima é a segunda enzima da via do heme, responsável por catalisar a condensação de duas moléculas de delta-aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) até a formação de seu produto, o porfobilinogênio (SASSA, 1998).

A glicação não enzimática de proteínas, tais como os resíduos de lisina no sítio ativo da  $\delta$ -ALA-D que ocorre no estado hiperglicêmico, juntamente com os resíduos de cisteína da  $\delta$ -ALA-D, resultam em sensibilidade da enzima frente a uma exposição ao oxigênio molecular. Esses fatores levam à inativação enzimática, contribuindo para a diminuição da atividade dessa enzima no DM (FERNÁNDEZ-CUARTERO et al., 1999; SCHMATZ et al., 2012). Sendo assim, uma vez que essa enzima é sensível ao estado pró-oxidante observado no DM, ela pode ser considerada um importante marcador de estresse oxidativo nessa doença (BRITO et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

A suscetibilidade de determinado órgão ou sistema ao estresse oxidativo é relacionada com o balanço entre os fatores pró-oxidantes, conforme citados anteriormente, e aqueles que os removem (GIUGLIANO et al., 1996). O sistema antioxidante é classificado em enzimático e não enzimático. O sistema antioxidante enzimático é representado principalmente pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), (VASCONCELOS et al., 2007). Os antioxidantes atuam em sinergismo um com o outro e contra diferentes tipos de radicais livres (MARITIM et al., 2003) (Figura 4).

As principais formas da enzima SOD (E.C. 1.15.1.1) são Cu/ZnSOD e a MnSOD, esta última é a isoforma mitocondrial que tem sua atividade alterada com a ocorrência de estresse oxidativo. Para isso, a SOD é responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, através da reação  $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$  (BABIOR, 1997; BROWNLEE, 2005; VASCONCELOS et al., 2007).

O peróxido de hidrogênio produzido nessa reação é degradado a oxigênio e água pela enzima CAT (E.C. 1.11.1.6), cujo sítio ativo contém o grupo heme e está situada no peroxissoma, a principal organela responsável pela desintoxicação celular. A reação a qual a CAT degrada o  $H_2O_2$  é:  $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$  (BABIOR, 1997; VASCONCELOS et al., 2007).

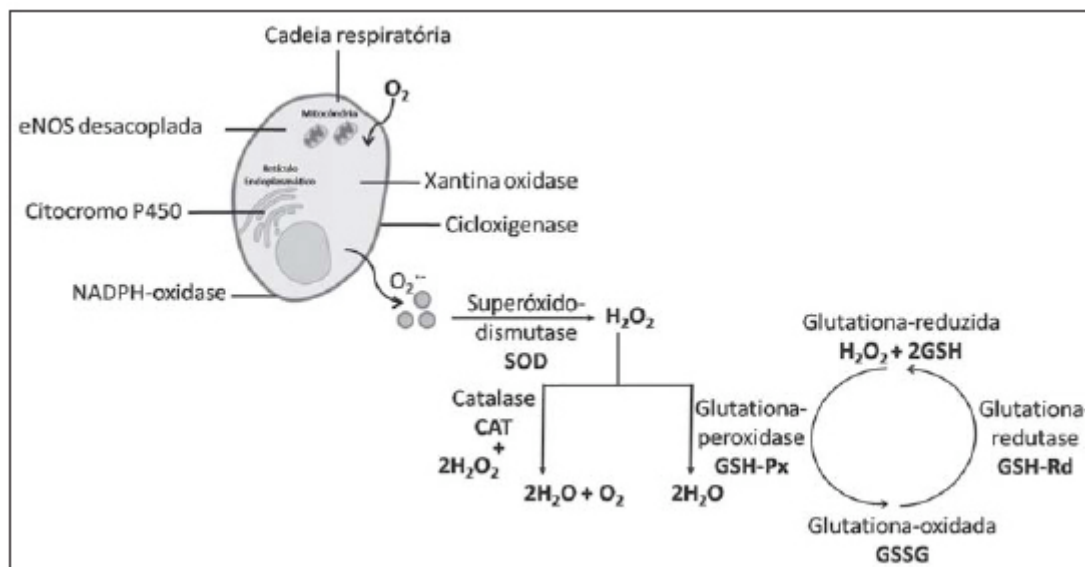


Figura 4 – Sistema antioxidante enzimático, representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GSH-Px). Fonte: DELBIN et al., 2009

Esses sistemas de defesas antioxidantes são responsáveis tanto por removerem quanto por inibirem a formação das EROs, porém não são 100% efetivos (HALLIWELL, 1994). Pesquisas mostram que elevações agudas nos níveis de glicose podem deprimir as defesas antioxidantes naturais, o que pode levar a redução da proteção contra os efeitos deletérios das EROs (GIUGLIANO et al., 1996).

As enzimas antioxidantes SOD e CAT comumente encontram-se inibidas no DM, como resultado da glicação não enzimática e oxidação (HAMDEN et al., 2009). Entretanto, podem ser observadas diferenças nos níveis de suas atividades em animais diabéticos, dependendo das variações na atividade da enzima ao longo do tempo, como por exemplo, a ocorrência de aumentos compensatórios frente ao estresse oxidativo ocasionado pelo estado diabético (GIUGLIANO et al., 1996).

Em relação ao sistema antioxidante não enzimático, este relaciona-se a um grupo de antioxidantes que podem ser agrupados em compostos produzidos *in vivo*, como a glutaciona, a ubiquinona e o ácido úrico, e em compostos obtidos diretamente da dieta tais como vitaminas E, C,  $\beta$  caroteno e outros (VASCONCELOS et al., 2007). Em busca de um aprimoramento da capacidade antioxidante do organismo frente a determinadas doenças, é importante o estudo de certos alimentos que são uma fonte não enzimática de antioxidantes.

Uma vez que pacientes diabéticos estão normalmente sob cuidados nutricionais, intervenções na dieta tornam-se uma parte essencial e importante ferramenta no tratamento da



doença, especialmente se elas forem capazes de reduzir as complicações diabéticas (SHARMA et al., 2006). Recentemente tem sido demonstrado grande interesse na busca de antioxidantes naturais provenientes de plantas a fim de substituir os antioxidantes sintéticos (RAHIMI et al., 2005). Aparentemente, as plantas, em especial aquelas com altos níveis de compostos antioxidantes, como a curcuma, tem um papel importante na melhora das desordens que envolvem o estresse oxidativo, tais como o DM (RAHIMI et al., 2005).

A curcuma (*Curcuma longa* L.) é uma planta herbácea, rizomatosa, da família Zingiberaceae, conhecida popularmente no Brasil como cúrcuma, açafrão ou açafrão da terra, sendo extensivamente usada na culinária indiana como componente do tempero em pó “curry” (MAIA et al., 1995; MURUGAN & PARI, 2007a). Esse composto, além de apresentar propriedades flavorizantes, também exibe propriedades farmacológicas (SHARMA et al., 2006) (Figura 5).

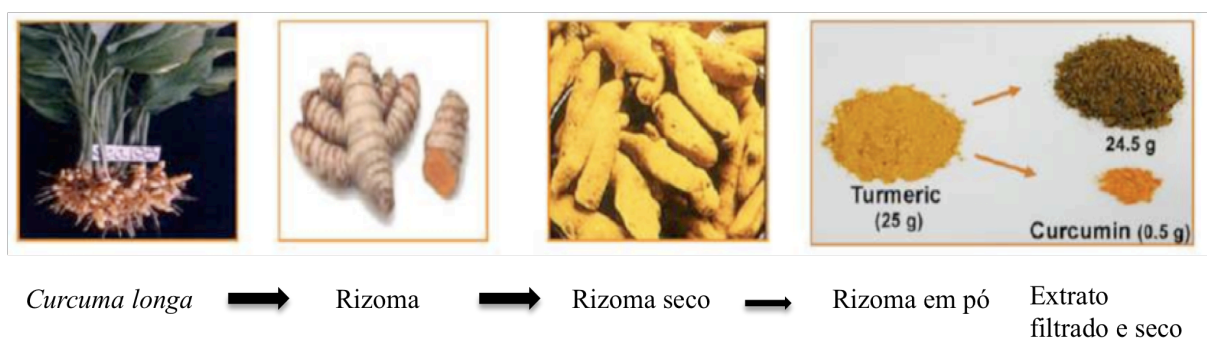


Figura 5 – Isolamento, extração e componentes da curcuma. Fonte: Jaques, 2010.

A curcumina, um polifenol hidrofóbico, é o principal constituinte ativo da curcuma. Além da curcumina, o açafrão contém outros constituintes denominados curcuminoides (ZHOU et al., 2011). Estruturalmente, a curcumina consiste em uma molécula de dibenzoil-metano (1,7bis(4-hidroxi-3- metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5diona) e dois grupos metoxila (OCH<sub>3</sub>) (ANAND et al., 2007) (Figura 6).

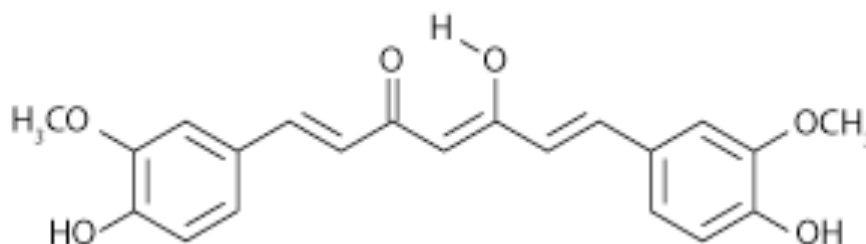


Figura 6 – Estrutura química da curcumina. Fonte: Bastos et al., 2009

A curcumina tem sido usada pelos seus efeitos medicinais benéficos há séculos, mas o primeiro caso documentado de seu uso como um adjuvante terapêutico provém de 1937, quando foi utilizada no tratamento de doenças biliares. Desde então seu potencial terapêutico tem sido explorado em doenças inflamatórias, neoplásicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e no diabetes *mellitus*, entre outras (SRIVASTAVA et al., 2011).

Acredita-se que a curcumina apresente propriedades antioxidantes, antiinflamatórias (MURUGAN & PARI, 2007a), anticancerígenas e antibacterianas (GUTIERRES et al., 2012). A atividade antioxidante e antiinflamatória da curcumina tem sido atribuída aos seus grupos hidroxil e metóxi, e tem sido proposta como candidata a novo auxílio terapêutico para o diabetes, por seqüestrar EROs em situações de estresse oxidativo celular (BASTOS et al., 2009) e por impedir a peroxidação lipídica, assim protegendo as biomoléculas dos danos oxidativos (KUNCHANDY & RAO, 1990).

Estudos experimentais confirmaram os efeitos potencialmente benéficos desse agente. O tratamento com curcumina em animais diabéticos induzidos com estreptozotocina apresentou melhoria em diversos parâmetros relacionados ao diabetes, dentre eles, observa-se que foi capaz de reduzir a hiperlipidemia (BABU & SRINIVASAN, 1997), retardar o desenvolvimento de catarata (SURYANARAYANA et al., 2005) e reduzir as disfunções renais provocadas pelo DM (BABU & SRINIVASAN, 1998; SHARMA et al., 2006; GUTIERRES et al., 2012). Além disso, a curcumina mostrou-se eficaz na redução dos níveis de glicose sanguínea, no aumento do status antioxidante das células  $\beta$  pancreáticas, no aumento dos níveis de insulina e na modulação de marcadores de função hepática e renal em diabetes experimental (NISHIYAMA et al., 2005; MURUGAN & PARI, 2007b).

Esse composto também levou a redução do consumo de água e aumento do peso corporal em ratos diabéticos (GUTIERRES et al., 2012) e redução dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro, fígado e rins (MURUGAN & PARI, 2006),

demonstrando que a curcumina pode atuar como um adjuvante no tratamento de pacientes diabéticos através da modulação do estresse oxidativo (MURUGAN & PARI, 2006),

Meghana et al. (2007) também observou, em ratos, que a curcumina melhora a liberação de insulina, retarda a geração de EROs nas ilhotas e previne a redução nos níveis de enzimas antioxidantes celulares, indicando que este composto protege as ilhotas contra o estresse oxidativo induzido pela STZ através da remoção de radicais livres. Outro estudo mostrou que a curcumina inibe a glicação proteica, peroxidação lipídica e a geração de EROs em eritrócitos expostos a altos níveis de glicose (JAIN et al., 2006). Esses achados fornecem evidências de um novo mecanismo pelo qual a suplementação com curcumina pode prevenir as disfunções celulares causadas pelo DM (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009).

Muitos estudos são necessários para melhor avaliação da eficácia e segurança da curcumina, assim como da sua combinação com terapias existentes. Não obstante, o baixo custo, a segurança farmacológica, a eficácia terapêutica e os diversos alvos moleculares fazem da curcumina um promissor agente para prevenção e tratamento de diversas doenças (ZHOU et al., 2011). Entretanto, como a maioria dos antioxidantes não revertem a hiperglicemia induzida pelo DM, esses agentes devem ser dados como adjuvantes ao tratamento com insulina, que neste caso é o principal tratamento para o DM1 (MARITIM et al., 2003).

Por todas as funções relatadas sobre a curcumina, esta pode ser considerada uma ferramenta terapêutica promissora a ser testada nas doenças metabólicas que envolvem dano oxidativo como, por exemplo, no diabetes *mellitus*, a fim de beneficiar pacientes com esta endocrinopatia.

Baseando-se nos achados que demonstram que a curcumina é um potente agente antioxidante e que a insulina é o tratamento de eleição do paciente diabético, o propósito deste estudo foi avaliar o efeito destes compostos sobre atividade das enzimas SOD e CAT no sangue, fígado e rins de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina. Além disso, buscou-se avaliar a peroxidação lipídica nesses tecidos através da mensuração dos níveis de TBARS e da atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, ambos considerados marcadores de estresse oxidativo no DM. Em adição, também foi avaliada a histopatologia do fígado e rim dos ratos saudáveis e diabéticos tratados com curcumina e/ou insulina.

## **2 CAPÍTULO I**

### **MANUSCRITO**

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista que será submetido:

#### **Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin**

Autores: Heloisa Einloft Palma, Patrícia Wolkmer, Miguel Gallio, Marcos Matoso Burgo Corrêa, Roberta Schmatz, Gustavo Thomé, Luciane Belmonte Pereira, Verônica Souza Paiva Castro, Andréia Bugnotto Pereira, Andressa Bueno, Lizielle Souza de Oliveira, Debora Rosolen, Thaís R. Mann, Bianca Cecco, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Cinthia Melazzo Mazzanti.

**Oxidative stress parameters in blood, liver and kidney of diabetic rats treated with  
curcumin and/or insulin**

Heloisa Einloft Palma<sup>a\*</sup>, Patrícia Wolkmer<sup>b</sup>, Miguel Gallio<sup>c</sup>, Marcos M.B. Corrêa<sup>a</sup>, Roberta Schmatz<sup>b</sup>, Gustavo R. Thomé<sup>b</sup>, Luciane B. Pereira<sup>b</sup>, Verônica S.P. Castro<sup>a</sup>, Andréia B. Pereira<sup>a</sup>, Andressa Bueno<sup>a</sup>, Lizielle S. de Oliveira<sup>b</sup>, Debora Rosolen<sup>a</sup>, Thaís R. Mann<sup>a</sup>, Bianca S. de Cecco<sup>a</sup>, Sonia T. A. Lopes<sup>a</sup>, Cinthia M. Mazzanti<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Small Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Address: Faixa de Camobi - Km 9, Avenida Roraima nº 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

<sup>b</sup> Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Address: Faixa de Camobi – Km 9, Avenida Roraima nº 1000, Campus Universitário, Prédio 18, 97105-900, Santa Maria –RS, Brasil.

<sup>c</sup> Department of Large Animals, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil. Address: Faixa de Camobi - Km 9, Avenida Roraima nº 1000, Campus Universitário, Hospital Veterinário, Sala 103, 97105-900, Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

\* Correspondence and reprints. Address: Departamento de Pequenos Animais da UFSM. Faixa de Camobi - Km 9, Campus Universitário, 97105-900, Hospital Veterinário, Sala 103, Santa Maria – RS, Brasil. Fax: +55 55 3220 8958.

E-mail address: [cmelazzo@yahoo.com.br](mailto:cmelazzo@yahoo.com.br) (Mazzanti,CM); [heinloft@hotmail.com](mailto:heinloft@hotmail.com) (PALMA,HE)

**Abstract**

Oxidative stress may exacerbate complications of diabetes mellitus. This study evaluated the effects of curcumin and/or insulin on antioxidant enzyme activity in blood, liver and kidney, as well as on lipid peroxidation and  $\delta$ -ALA-D activity of streptozotocin-induced diabetic rats. In addition, it was performed a histopathological analysis of the liver and kidney of healthy and diabetic rats treated with these compounds. The animals were divided into six groups (n=6): Control/Saline (C); Control/Curcumin (CCur); Diabetic/Saline (D); Diabetic/Insulin (DIns); Diabetic/Curcumin (DCur) and Diabetic/Insulin/Curcumin (DInsCur). Curcumin was diluted in corn oil and administered at the dosage of 60mg/kg once a day, and insulin was administered twice a day, at the dosage of 1.5IU/rat in the morning and 2.5IU/rat in the afternoon, for a period of 30 days. In groups D and DCur, the histological analysis of the liver revealed elevated number of binucleated hepatocytes and alterations in hepatic trabeculae. In kidney there were vacuolization of tubular cells, glomerular congestion and mononuclear inflammatory focus. The treatment with insulin ameliorate renal and hepatic lesions from both DIns and DInsCur groups. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels were increased in serum of D and DInsCur groups and in hepatic and renal tissue of group D ( $P<0.05$ ); insulin and/or curcumin prevented an increase in all groups ( $P<0.05$ ). Catalase (CAT) activity was low in liver and kidney of groups D, DIns and DCur; there was significant increase in kidney of DInsCur group; in blood, CAT activity was high in groups D and DInsCur ( $P<0.05$ ). Superoxide dismutase (SOD) activity in blood was decreased in groups D and DInsCur and increased in groups DIns and DCur ( $P<0.05$ ). In liver, it was increased in groups D and DInsCur. Delta aminolevulinic dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity was reduced in liver and kidney of diabetic rats and treatment with insulin and/or curcumin prevented the decrease of the activity in hepatic tissue from groups DIns, DInsCur and DCur, and renal tissue from groups DCur and DInsCur. Thus, treatments with curcumin or insulin prevented oxidative stress in blood of diabetic rats, through modulation of

enzymatic antioxidant defenses. Regarding lipid peroxidation, both substances presented positive effect in serum, liver and kidney, except in serum from group DInsCur, revealing a negative effect when curcumin and insulin were associated. These findings contributed to the comprehension that antioxidants from medicinal plants, such as curcumin, can be used as adjuvant in the treatment of this endocrinopathy and not as single therapy.

**Key words:** diabetes mellitus, catalase, superoxide dismutase, lipid peroxidation, curcumin,  $\delta$ -ALA-D.

## 1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a systemic disease affecting a significant proportion of the population worldwide (Rahimi, et al., 2005). This metabolic disorder is characterized by insufficiency of secretion or action of endogenous insulin and hyperglycemia. Type 1 DM (or insulin dependent) is an autoimmune disease in which the patient's own immune system reacts against islet antigens and destroys the  $\beta$  cells (Robertson, 2004). Streptozotocin (STZ) is an agent widely employed to induce experimental diabetes type 1 due to its ability to selectively destroy pancreatic islet  $\beta$ -cells (Maritim, et al., 2003; Wu and Huan, 2008), and this method have been used to study aspects of the pathophysiology of this disease.

The hyperglycemia during DM is the pivotal mechanism that leads to oxidative stress and increased production of reactive oxygen species (ROS) that activate many pathways of diabetic tissue damage, which include glucose autoxidation, protein kinase-C activation, hexosamin metabolism, sorbitol formation, and oxidative phosphorylation (Brownlee, 2001; Robertson, 2004). When ROS accumulate in excess for prolonged periods of time, they cause chronic oxidative stress and adverse effects (Robertson, 2004). Therefore oxidative stress is a principal pathogenic mechanism in the progression of diabetes (Ceriello, 2000) and may play

an important role in the development of many diabetic late complications, including cardiovascular, renal and nervous system disease (Daneman, 2006; Maiese, et al., 2007; Osawa and Kato, 2005).

The ROS formed oxidize various types of biomolecules, causing severe damage to biological molecules, especially to DNA, lipids and proteins, finally leading to cellular lesions by damaging DNA or stimulating apoptosis for cell death (Anderson, 1996; Finkel and Holbrook, 2000; Halliwell, 1994; Wiernsperger, 2003). Also, glycosylation through acetylation of free amino groups can result in inhibition of enzymes sensitive to pro-oxidant states, such as delta aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) (Fernandez-Cuartero, et al., 1999), which can then be used as marked sensitive to oxidative stress (Folmer, et al., 2003). If mild stress occurs, tissues can respond by increasing antioxidant defenses, which are able to normalize ROS (Anderson, 1996; Wiernsperger, 2003).

To prevent oxidative damage, cell membranes contain enzymatic scavengers that detoxify the ROS, as superoxide dismutase (SOD), that converts superoxide ( $O_2^-$ ) to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px), these both convert  $H_2O_2$  to water (Finkel and Holbrook, 2000). However, in the event of excessive ROS production, as occurs in DM, this natural enzymatic system may be inadequate, and lipoperoxidation will occur (Murugan and Pari, 2007). The lipid peroxidation is usually evaluated by measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which analyzes the malondialdehyde (MDA) present in the sample. Although the body has its own antioxidant defense systems, the defense can be externally strengthened (Kaneto, et al., 1999).

There are a number of substances with scavenger activities in lipid-free radical intermediates of the autocatalytic chain reaction. In this case, oxidative damage can be diminished by antioxidant supplementation. Recently, much attention has been focused on suppression of oxidative stress by dietary antioxidants (Osawa and Kato, 2005). Curcumin



(diferuloylmethane), a free radical scavenger, is a well known dietary antioxidant and the active ingredient derived from the rhizomes of a plant (*Curcuma longa*), which exhibits a variety of therapeutic properties, including anti-inflammatory, antioxidant, chemopreventive and chemotherapeutic activity (Hassaninasab, et al., 2011). Curcumin has been used in the treatment of many diseases, including diabetes mellitus. Since the majority of antioxidants do not reverse diabetes-induced hyperglycemia and these agents must be given as adjuvant to insulin therapy (Maritim, et al., 2003).

Therefore, it is important to evaluate the potential of curcumin as an antioxidant agent and its association with the pathogenesis of different diabetic complications. Thus, the present study was carried out to investigate the effects of curcumin and/or insulin on the oxidative stress parameters in diabetic rat blood, hepatic and renal tissues. In addition, it was performed a histopathological analysis of the liver and kidney of healthy and diabetic rats treated with these compounds.

## 2. Material and methods

### 2.1 Reagents

Streptozotocin (STZ),  $\delta$ - aminolevulinic acid ( $\delta$ -ALA), curcumin (curcumin > 80%), tris (hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, and thiobarbituric acid (TBA), were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). All other reagents used in the experiments were of analytical grade and of highest purity.

### 2.2 Animals

Adult male Wistar rats (*Rattus norvegicus*), average 90 days old and 250-300 grams of weight, from the central animal house of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were used. The animals were maintained at a constant temperature (25°C) on a 12h light/dark

cycle, fed with free access with commercial food, water *ad libitum* and submitted to a period of 7 days of adaptation.

### *2.3 Diabetes mellitus type 1 induction*

Type 1 DM was induced by an intraperitoneal injection of 60mg/kg streptozotocin (STZ), diluted in 0.1M sodium-citrate buffer (pH 4.5). The control rats received the same amount of sodium-citrate buffer. STZ-treated rats received 5% of glucose instead of water for 24h after diabetes induction in order to avoid death caused by hypoglycemic shock. Blood samples were taken from the tail vein two weeks after STZ to measure glucose levels with a portable glucometer (Accu-Check Nano Performa®, Roche). Only animals with fasting glycemia over 250mg/dL were considered diabetic and used for the study.

### *2.4 Experimental design and curcumin treatment*

The animals were divided into six groups (n=6): Control/Saline (C); Control/Curcumin (CCur); Diabetic/Saline (D); Diabetic/Insulin (DIns); Diabetic/Curcumin (DCur) and Diabetic/Insulin/Curcumin (DInsCur). Two weeks after DM induction, the supplemented animals received daily administration of 60mg/kg of curcumin diluted in corn oil and administered orally in the morning (08:00 a.m.). The rats treated with insulin received two daily subcutaneous administrations of insulin (HUMULIN N U-100 NPH®, Lilly), at the dosage of 1.5IU/rat in the morning (08:00 a.m.) and 2.5IU/rat in the afternoon (06:00 p.m.). The rats were treated for a period of 30 days. Animals who were not treated with curcumin received saline solution and corn oil orally, and the animals who were not treated with insulin received sterile saline solution via subcutaneous route. The choice of 60mg/kg of curcumin dosage was made based in previous studies, in which the authors have observed beneficial results (Kuhad and Chopra, 2007), and the dosage of insulin was adjusted based on the glycemic parameters measured during the experiment.

### *2.5 Collection and preparation of blood samples*

After 30 days the rats were anesthetized with halothane and blood was collected by cardiac puncture. Blood samples for TBARS assay were collected in tubes without anticoagulant and serum was obtained by centrifugation at 2000g during ten minutes. CAT and SOD activities were determined using whole blood (1.5mL) collected in citrated tubes and diluted (1:10) in saline solution.

### *2.6 Histological studies*

Kidneys and liver were fixed at 10% neutral buffered formalin solution, embedded in paraffin and used for histopathological examination. Sections were cut, deparaffinized, hydrated and stained with haematoxylin-eosin. Hepatic and renal morphology and possible alterations were observed at 400x magnification.

### *2.7 Lipid peroxidation*

Serum lipid peroxidation were measured through TBARS levels as described by Jentzsch et al. (1996) and expressed as nmol MDA/mg protein. The liver and kidney were removed, and the samples used for TBARS assay were placed on ice and homogenized in cold 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged at 2000g at 4°C for 10 min to yield the low speed supernatant that was used for TBARS assay. Lipid peroxidation was estimated colorimetrically by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) using the method described by Ohkawa et al. (1979), and expressed as nmol MDA/mg protein.

## 2.8 Enzyme assay

### 2.8.1 Catalase (CAT) activity

For the CAT assay, liver and kidney were homogenized in 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 at a proportion of 1/10 (w/v) and 1/5 (w/v), respectively. The homogenate was centrifuged at 2000g for 10 min to yield a supernatant that was used for the enzyme assay. CAT activity in blood, liver and kidney was measured by the method of Nelson & Kiesow (1972) and expressed as U/mg protein.

### 2.8.2 Superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of SOD on liver and kidney was evaluated according to Misra & Fridovich (1972). The organs were diluted with Tris-HCl pH 7.4 at a proportion of 1/60 (w/v) and 1/40 (w/v) respectively. In blood, SOD activity was measurement as described by Misra & Fridovich (1972), based on the inhibition of the radical superoxide reaction with adrenalin. The results were expressed as U SOD/mg protein.

### 2.8.3 $\delta$ -ALA-D activity

$\delta$ -ALA-D activity in hepatic and renal tissues was determined according to Sassa (1982), by measuring the rate of porphobilinogen formation. 200  $\mu$ L of sample was incubated for 0.5 h (liver) and 1 h (kidney) at 37°C. The reaction was stopped by addition of 250  $\mu$ L of trichloroacetic acid. The reaction product was determined using modified Ehrlich's reagent at 555 nm. ALA-D activity was expressed as nmol porphobilinogen/mg protein/h.

### 2.8.4 Biochemical analysis

The activities of the serum enzymes alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and  $\gamma$ -glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) and the levels of creatinine were determined using standard commercial kits (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG) in a semi-automated spectrophotometer BioPlus (Bio-2000). The samples for enzymatic assay were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2.9 Protein determination

Protein was measured by the method previously described (Bradford, 1976), using bovine serum albumin as standard.

### 2.10 Statistical analysis

Data was analyzed statistically by one/two-way ANOVA followed by Duncan's multiple tests. Differences were considered significant when the probability was  $P < 0.05$ . The values were represented as mean  $\pm$  standard deviation.

## 3. Results

### 3.1 *Blood glucose and body weight*

In the end of the experiment, the blood glucose levels were significantly increased, while the body weight was significantly decreased in groups D and DCur when compared to the onset of the experiment. Groups that were treated with insulin (DIns and DInsCur) presented a reduction in glucose levels and an increase in body weight when compared to the onset of the experiment (Table 1).

### 3.2 *Histological findings*

The light microscope findings of kidney and liver of control rats showed normal structure. Similar to the control group, healthy non-diabetic rats that received curcumin did

not present any histological alteration. Histological changes were detected in the liver and kidney of diabetics rats, treated or not with curcumin (groups D and DCur). In these animals, liver presented elevated number of binucleated hepatocytes, discrete cariomegalocytosis and trabeculae were disaggregated (Figure 1). Some hepatic sinusoid were dilated. In kidney it was observed vacuolization of tubular cells (Figure 2), cytoplasmic granulation of tubular cells, mononuclear inflammatory focus, and glomerular congestion. The alterations were significantly attenuated by insulin treatment in groups DIns and DInsCur when compared to groups D and DCur.

### 3.3 Lipid peroxidation

In this study, diabetic rats (group D) presented an increase in lipid peroxidation in serum, and in hepatic and renal tissues, when compared to C and CCur groups ( $P < 0.05$ ), demonstrated through TBARS production (Figures 3A, 3B and 3C, respectively). However, treatment with curcumin and/or insulin prevented an increase of hepatic and renal lipid peroxidation in groups DIns, DCur and DInsCur, and in serum, in groups DIns and DCur when compared to D group ( $P < 0.05$ ). On the other hand, a significant increase on TBARS levels in serum was observed in DInsCur group, when compared to the D group.

### 3.4 Catalase (CAT) activity

Considering CAT activity in blood (Figure 4A), group D showed a higher activity of this enzyme when compared to C and CCur groups ( $P < 0.05$ ). DIns and DCur groups did not show the same increase. No significant difference was observed between DIns, C and CCur groups. Also, there was observed a decrease in CAT activity in groups DIns and DCur, when compared with D group ( $P < 0.05$ ). CAT activity in liver and kidney (Figures 4B and 4C, respectively) was significantly decreased in the D group when compared to the C group

( $P < 0.05$ ). The treatment with curcumin prevented this decrease in the enzyme activity only in renal tissue from group DInsCur when compared to D group ( $P < 0.05$ ), but this decrease was not maintained at the same levels as observed on group C. Treatment with insulin did not significantly alter the CAT activity in liver and kidney in DIns group when compared to D group. Treatment with curcumin (DCur) showed a higher decrease in CAT activity in liver and kidney when compared to D group ( $P < 0.05$ ).

### 3.5 *Superoxide dismutase (SOD) activity*

Evaluating SOD activity in blood and hepatic tissue (Figures 5A and 5B, respectively), there was a significant decrease in group D when compared to C and CCur groups. Groups DIns and DCur revealed higher levels of this enzyme activity in blood when compared to group D, and DInsCur group revealed the same levels as those observed in group D. In hepatic tissue, group treated with insulin (DIns) presented high activity of SOD enzyme when compared to group D ( $P < 0.05$ ), however, group treated with curcumin (DCur) was not significantly different from group D. Group DInsCur presented a slight increase of SOD activity in hepatic tissue when compared to group D ( $P < 0.05$ ). SOD activity in the kidneys was not significantly different among the groups (Figure 5C).

### 3.6 $\delta$ -ALA-D activity

The activity of  $\delta$ -ALA-D was significantly reduced in hepatic and renal tissues of diabetic rats (Figures 6A and 6B, respectively). Treatment with insulin (DIns) did not prevent the decrease of the enzyme activity in renal tissue when compared to C and CCur groups ( $P < 0.05$ ); however, the administration of curcumin (DCur) and curcumin in association with insulin (DInsCur) caused an increase in enzyme activity when compared to group D ( $P < 0.05$ ).

In hepatic tissue, treatment with insulin (DIns) prevented a reduction of the  $\delta$ -ALA-D activity, when compared to diabetic group (D) ( $P < 0.05$ ). The same occurred with the group that received insulin and curcumin (DInsCur). The diabetic rats that received only curcumin (DCur) did not present such a great enhance in enzyme activity as groups DIns and DInsCur, but it was increased when compared to group D ( $P < 0.05$ ).

### 3.7 Biochemical analysis

The activity of serum enzymes ALT, AST and  $\gamma$ -GT was higher in diabetic rats (Group D) when compared to control rats (Group C) ( $P < 0.05$ ). The animals treated with insulin (DIns) presented a significant reduction of these enzymes activities. Treatment with curcumin was not able to prevent the rise of the enzymes activities ( $P < 0.05$ ), but the increase was less extent than those observed in group D. The rats treated either with insulin and curcumin (DInsCur) showed the same activity levels as observed in group C, with a significant reduction of enzymes activities when compared to group D. It was not observed a significant difference in creatinine levels among any of the groups of this study ( $P > 0.05$ ) (Table 2).

## 4. Discussion

Oxidative stress and enhanced production of free radicals are the main events involved in the pathogenesis of diabetes and its complications (Rahimi, et al., 2005). In DM some features are expected, such as an increase in lipid peroxidation, a decrease in the content of individual natural antioxidants, and a reduction in the antioxidant enzyme activities (Hamden, et al., 2009). Use of antioxidants reduces oxidative stress and alleviates diabetic complications, and since curcumin is a powerful antioxidant with antidiabetic effects (Hatcher, et al., 2008; Rahimi, et al., 2005), this study investigated the effects of curcumin and/or insulin on oxidative stress parameters in blood, liver and kidneys of diabetic rats.



In our study, the supplementation with curcumin to healthy non-diabetic rats did not cause any structural change in liver nor in kidney. Babu & Srinivasan (1998) and Sharma et al., (2006) observed in their study that feeding curcumin to diabetic rats produced a decrease in the degree of renal pathology when compared to those fed control. In our study, however, the administration of curcumin *per se* to diabetic rats did not reverse histological alteration in both organs, liver and kidney, suggesting that this compound was not able to prevent structural alterations in diabetic rats. On the other hand, treatment with insulin resulted in more preservation of histological integrity, with a decrease in tubular damage and interstitial inflammation in kidney. In the liver, it was observed a reduction in the number of binucleated hepatocytes and disaggregation of trabeculae from DIns and DInsCur groups, suggesting that insulin was able to protect both organs, probably because of its capacity to reduce glycemic levels.

In the diabetic status, lipid peroxidation would increase as a consequence of the reaction of unsaturated lipids with different radicals and/or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Caballero, et al., 2000). In our study, the levels of TBARS were significantly increased, revealing a lipid peroxidation in serum, liver and kidneys of diabetic rats (group D). Santini et al. (1997) also observed that antioxidant defenses are defective in diabetic patients, leading to enhancement of oxidative stress that determines chemical changes in cellular components, resulting in lipid peroxidation that causes impairment of membrane functions and cell death (Rahimi, et al., 2005). Lipid peroxidation causes the loss of cellular functions through the inactivation of membrane enzymes and cytoplasmic proteins (Stark, 2005), increasing the severity of pathological tissue changes in type 1 DM (Santini, et al., 1997).

To counteract oxidative damage caused by ROS generated during disease, there is a multilayered defense system including DNA repair systems, scavenging substances and antioxidant enzyme systems as well as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and

glutathione peroxidase (GSH-Px) (Callahan, et al., 1988; Gate, et al., 1999). In DM, in which ROS are highly increased, there are controversial results about the antioxidant enzyme activities (Turk, et al., 2002). In our study, activity of CAT was decreased in hepatic and renal tissue of diabetic rats and this result is very similar to those observed by Sharma et al. (2006).

SOD activity was reduced in blood and liver of group D when compared to group control, maybe because excess of ROS cause an inactivation of the enzyme activity. CAT activity in blood was high, perhaps because SOD, the first defense line against ROS, was already decreased at the moment of the analysis and CAT was still trying to maintain the antioxidant status of the organism, once a compensatory increase in antioxidant enzymes is desirable (Turk, et al., 2002). Murugan & Pari (2007) observed that a reduction in the activity of antioxidant enzymes might be due to increased utilization for scavenging free radicals, leading to depletion of the enzymes. Since blood SOD activity was low in our study, we can conclude that it did not have an adequate ROS scavenging, and the excess of free radicals led to lipid peroxidation.

Zobali et al. (2002) cited that an insulin treatment regiment may cause a reversion in the typical symptoms and biochemical abnormalities of DM, but this substance has been shown to be unable to completely inhibit protein glycation. In this context, oxidative stress remains elevated in diabetic state. In our experiment, therapy with insulin was able to prevent an increase in TBARS levels in serum, liver, and kidney, showing a protective effect of this substance when compared to group D, probably due to the reduction of glycemic levels of DIns group. Regarding antioxidant enzymes, SOD activity in blood and liver was higher in DIns group when compared to group D, showing intent of the organism to enhance antioxidant status.

CAT in blood presented a similar activity than those observed previously in group DCur; the increase was not so significant as group D, probably because there was no need for

a great increase of the antioxidant enzymes when the damage was not so intense, which can be corroborated by the low TBARS levels observed in this group. Another explanation would be because SOD activity in group DIns is higher than in group D, and this enzyme, being the first line of defense of the organism, was still able to protect against hyperglycemic damage. However, in hepatic and renal tissue, insulin could not prevent a reduction of CAT activity, indicating exhaustion of this enzyme.

Antioxidants play an important role in the improvement of diabetes (Rahimi, et al., 2005) and numerous studies reveal that curcumin attenuates diabetes and diabetes-associated symptoms (Aggarwal and Harikumar, 2009). In this study, daily administration of curcumin (group DCur) resulted in lipid peroxidation marker near to normal levels in serum, and hepatic and renal tissues when compared to diabetic rats (group D), showing a beneficial effect of this compound on improving the antioxidant status, preventing oxidative stress (Murugan and Pari, 2007).

However, curcumin at the dosage of 60mg/kg could not prevent a decrease in CAT activity neither in liver nor in kidney from group DCur, this reduction could be due to enzyme depletion. An overproduction of ROS or an inactivation of antioxidants shift the oxidative stress/antioxidant balance in favor of stress, leading to the deleterious effects of ROS (Wiernsperger, 2003). But, at this moment, the organism was still trying to protect against ROS formation through the increment of antioxidant enzymes, as we could see by increased CAT and SOD activities in blood, which lead us to think that curcumin inhibit oxidative damage probably due to the antiperoxidative effect of this compound. The increased levels of ROS scavenging enzymes may act as an added compensation mechanism to maintain the cell integrity and protection against ROS damage by the effects of curcumin on inhibition of free radicals (Murugan and Pari, 2007).

Thus, we observed that the use of curcumin protected the hepatic and renal tissues against lipid peroxidation, however it could not increase enzymatic antioxidant activity in these organs, which is different from data shown by Sharma et al. (2006), in which curcumin decreased TBARS levels and increased SOD and CAT activities, revealing a renoprotective effect. However, this improvement could be seen in blood samples in this study. The protective effects of curcumin seem to result from its inhibitory effect on ROS production, and in consequence, causing a decrease in lipid peroxidation, which play a role in improving renal dysfunction in diabetes (Sharma, et al., 2006).

When insulin and curcumin were administered together (group DInsCur), lipid peroxidation in serum was higher than group D, showing a negative effect between both substances. When in association with insulin, the dosage of 60mg/kg of curcumin became deleterious, since antioxidants may act negatively when overdosed, becoming pro-oxidant (Wiernsperger, 2003). In hepatic and renal tissue, however, insulin and curcumin prevented an increase in lipid peroxidation and we can conclude that this association was protective to the cells of this organ, as demonstrated by histological analysis from these organs in this study.

CAT activity evaluated in blood and the kidneys were high, revealing a positive interaction between insulin and curcumin. However, this positive interaction was not observed in hepatic tissue, suggesting a exhaustion of this enzyme in this organ. The enhancement in CAT activity might be a primary defense response, acting as a scavenger under the oxidative insult provoked by diabetes (Caballero, et al., 2000). Turk et al. (2002) explained that a negative correlation between TBARS levels and CAT activity occurs because  $H_2O_2$  is liposoluble and it can simply pass through the cell membrane, leading to hydroxyl radical ( $OH^\bullet$ ) production. This radical is the most reactive between all ROS, and its formation is the first step in lipid peroxidation. CAT hinders  $OH^\bullet$  formation, and when a tissue presents high

CAT activity, the deleterious effects of OH<sup>•</sup> radical will be less extensive, minimizing lipid peroxidation and complications related to diabetic state. Sanguine SOD did not show an increase in its activity when compared to diabetic untreated rats and a slight increase in SOD activity in liver of rats from group DInsCur, with similar levels than group D, may be due to a depletion of this enzyme. Thus, in our study, the administration of 60mg/kg of curcumin in association with insulin was not beneficial to reducing the damage caused by ROS generation in diabetic rats.

In relation to enzyme delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D), the results of this study are in accordance with other experiments with diabetes that describe a significant inhibition of this enzyme activity. According to Fernández-Cuartero et al. (1999),  $\delta$ -ALA-D activity was reduced in human diabetic patients and experimental DM in rats. Schmatz et al. (2012) and Kade et al. (2009) found a decrease in  $\delta$ -ALA-D activity in both hepatic and renal tissues of diabetic rats, which may be linked to the significant reduction in the antioxidant defenses observed in these animals.

According to Schmatz et al. (2012), the use of antioxidants may minimize the deleterious effects of diabetes preventing a decrease in  $\delta$ -ALA-D activity. In our study, treatment with curcumin and/or insulin also prevented a reduction  $\delta$ -ALA-D activity in the liver of diabetic rats, and the treatment with curcumin and the association of insulin and curcumin improved enzyme activity in renal tissue. Thus we can conclude that these substances were able to prevent the mechanisms related to the enzyme inhibition observed in the diabetic state.

The control of DM can modify the activity of  $\delta$ -ALA-D. Since  $\delta$ -ALA-D is sensitive to pro-oxidant states, that indicates that controlled diabetic patients are exposed to a lower level of oxidative stress than uncontrolled diabetic patients (Souza, et al., 2007). In this view, it is possible to hypothesize that insulin therapy may prevent inhibition of  $\delta$ -ALA-D activity,

once this drug can reduce the damage occurred during diabetic conditions. This fact was observed in this study, once insulin was able to reduce oxidative stress in the liver, and therefore preventing a decrease of  $\delta$ -ALA-D activity.

The molecular mechanisms underlying  $\delta$ -ALA-D impairment in diabetes is still not completely understood (Brito, et al., 2007). Garro et al. (1990) suggested that other factors or the glucose itself, but by alternative slower mechanisms (i.e. glycosilation) would result in enzyme inhibition. Schmatz et al. (2012) also cited that the  $\delta$ -ALA-D inhibition is not closely related to hyperglycemia. Some late complications of diabetes are associated with alterations in the structure and function of proteins due to glycations and free radical generation (Caballero, et al., 2000). The non-enzymatic glycosilation of proteins, such as the lysine residue from the active site of  $\delta$ -ALA-D (Souza, et al., 2007) occurring in DM leads to enzyme inactivation, contributing to the decrease in ALA-D activity (Fernandez-Cuartero, et al., 1999).

Also, the cysteinyl residues from this enzyme are highly sensitive to molecular oxygen causing enzyme inhibition (Brito, et al., 2007). Oxidative stress can be considered an important factor that contributes to the change in  $\delta$ -ALA-D activity (Souza, et al., 2007). In this view, the enzyme  $\delta$ -ALA-D can be considered an important marker of oxidative stress (Brito, et al., 2007).

Biochemical profile was realized in order to verify hepatic and renal functions of the animals (Fernandez-Cuartero, et al., 1999). Another concerning point to be observed here is that liver and kidney functions are highly altered in diabetic state (Murugan and Pari, 2007). As it is known, DM is related to elevated hepatic enzymes activities (Hussein & Abu-Zinadah, 2010), that may be a result of the liver cell destruction or changes in the membrane permeability indicating severe hepatocellular damage (Schmatz, et al., 2012). The excess of

free fatty acids and ROS in the liver of diabetic patients is toxic to hepatocytes, and can result in elevated transaminases (Harris, 2005).

In this view, we measured the activities of the enzymes alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), that are intracellular hepatic enzymes that may be leaked to the circulation, serving as a marker of hepatocellular injury, and  $\gamma$ -glutamyl transferase ( $\gamma$ -GT), that acts as a marker of biliary function and cholestasis (Harris, 2005).

As expected, and in accordance to other studies (El-Demerdash, et al., 2005; Murugan and Pari, 2007; Schmatz, et al., 2012), in this experiment, diabetic rats (D) presented increased serum activity of ALT, AST and  $\gamma$ -GT when compared to control (C) and control curcumin (CCur) groups. On the other hand, the administration of curcumin to diabetic animals (DCur) presented only a slight improvement of protection against the increase in these enzymes activities, especially in ALT, when compared to D group, demonstrating that this compound was able to give few protection to the hepatic tissue.

Jeschke et al. (2005) and Hamden et al. (2009) observed in their studies that insulin decreases AST and ALT activities, thus its administration can attenuate liver damage. In our study, insulin protected against the increase in the activity of these enzymes in diabetic rats (group DIns), and treatment with both insulin and curcumin (group DInsCur) also caused a reduction in the activity of these enzymes in serum, demonstrating the protective effect of insulin against hepatic damage induced by diabetic state.

The administration of insulin results in augmentation of glycolysis (Jeschke, et al., 2005; Morimoto, et al., 1996) and the decrease in high hepatic glucose levels prevents liver injury. Indeed, in our study, insulin prevented the lipid peroxidation in hepatic tissue when used alone (DIns) and in association with curcumin (DInsCur).

Another important consequence of the diabetic state is renal disease. In this study, renal function was also evaluated, through the levels of creatinina excreted by the kidneys.

Murugan and Pari (2007) already reported that diabetic rats present high levels of creatinine as compared to control rats and diabetic rats treated with curcumin showed the reversed of this parameter near to normal. However in our study, there was no significant difference in creatinine levels among any of the groups, and the reason for this can not be elucidated, once it was observed in renal tissue a increased level of lipid peroxidation and a reduction of CAT activity, as well as a great damage as observed in histopathological analysis of renal tissue.

## **5. Conclusions**

In this study we conclude that treatments with curcumin or insulin were beneficial, once they prevented oxidative stress in blood of STZ-induced diabetic rats, trough modulation of antioxidant enzymes and prevention of lipid peroxidation. In hepatic and renal tissue it was not possible to observe the same protective effect in relation to antioxidant enzymes, suggesting that oxidative stress may be involved with complications related to the diabetic state. Treatment with insulin and/or curcumin was able to prevent lipid peroxidation in serum, liver and kidney of diabetic rats, suggesting a protective effect of these compounds on oxidative damage caused by diabetic hyperglycemia. We can also conclude that  $\delta$ -ALA-D activity can be used as a parameter to evaluate oxidative stress, once this enzyme activity was inhibited in diabetic rats and treatment with curcumin and/or insulin prevented a decrease in its activity in hepatic and renal tissue. In this study, it was observed the importance of insulin as a primary treatment of DM, once this drug was able to prevent cellular damage and to preserve hepatic and renal architecture of diabetic rats. These findings contributed to comprehend that antioxidants from medicinal plants, such as curcumin, must be used as adjuvant, and not as a single therapy, to treat this endocrinopathy.



## Acknowledgement

We thank Brazilian Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES for supported this work.

## Ethical approval

The procedure was approved by the Animal Welfare Committee of UFSM, number 018/2012, in accordance to Brazilian laws and ethical principles published by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

## References

- Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41: 40-59.
- Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res* 1996;350: 103-8.
- Babu P., Srinivasan, K. Amelioration of renal lesions associated with diabetes by dietary curcumin in streptozotocin diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998;181: 87-96.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72: 248-54.
- Brito VB, Folmer V, Soares JC, Silveira ID, Rocha JB. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the delta-aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutrition* 2007;23: 818-26.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414: 813-20.
- Caballero F, Gerez E, Batlle A, Vazquez E. Preventive aspirin treatment of streptozotocin induced diabetes: blockage of oxidative status and reversion of heme enzymes inhibition. *Chem Biol Interact* 2000;126: 215-25.
- Callahan HL, Crouch RK, James ER. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitol Today* 1988;4: 218-25.
- Ceriello A. Oxidative stress and glycemc regulation. *Metabolism*, 2000;49: 27-29.
- Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet* 2006;367: 847-58.

- El-Demerdash FM, Yousef MI, El-Naga NI. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol* 2005;43: 57-63.
- Fernandez-Cuartero B, Rebollar JL, Batlle A, Enriquez de Salamanca R. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31: 479-88.
- Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408: 239-47.
- Garro JC et al. Glucose effect on haem metabolism. *Molec. Aspects Med.* 1990;11: 28.
- Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JB. A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J Nutr* 2003;133: 2165-70.
- Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* 1999;53: 169-80.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994;52: 253-65.
- Hamden K, Boujbiha MA, Masmoudi H, Ayadi FM, Jamoussi K, Elfeki A. Combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats. *Biomed Pharmacother* 2009;63: 95-9.
- Harris EH. Elevated liver function tests in type 2 diabetes. *Clinical Diabetes* 2005;23:115-119.
- Hassaninasab A, Hashimoto Y, Tomita-Yokotani K, Kobayashi M. Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108: 6615-20.
- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 2008;65: 1631-52.
- Hussein HK, Abu-Zinadah, OA. Antioxidant effect of curcumin extracts in induced diabetic Wistar rats. *Int. J. Zool. Res* 2010.
- Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Bielsalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 1996;20: 251-256.
- Jeschke MG, Rensing H, Klein D, Schubert T, Mautes AE, Bolder U, Croner RS. Insulin prevents liver damage and preserves liver function in lipopolysaccharide-induced endotoxemic rats. *J Hepatol* 2005;42: 870-9.
- Kade IJ, Borges VC, Savegnago L, Ibukun EO, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JB. Effect of oral administration of diphenyl diselenide on antioxidant status, and activity of delta aminolevulinic acid dehydratase and isoforms of lactate dehydrogenase, in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biol Toxicol* 2009;25: 415-24.

- Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, Matsuoka T, Fujitani Y, Umayahara Y, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Yamasaki Y, Hori M. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes* 1999;48: 2398-406.
- Kuhad A, Chopra K. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats: behavioral and biochemical evidences. *Eur J Pharmacol* 2007;576: 34-42.
- Maiese K, Morhan SD, Chong ZZ. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Curr Neurovasc Res* 2007;4: 63-71.
- Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003;17: 24-38.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247: 3170-5.
- Morimoto Y, Kamiike W, Nishida T, Hatanaka N, Shimizu S, Huang TP, Hamada E, Uchiyama Y, Yoshida Y, Furuya E, Matsuda H. Improvement of rat liver graft function by insulin administration to donor. *Gastroenterology* 1996;111: 1071-80.
- Murugan P, Pari L. Influence of tetrahydrocurcumin on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in experimental type 2 diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2007;113: 479-86.
- Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the UV). *Anal Biochem* 1972;49: 474-8.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95: 351-8.
- Osawa T, Kato Y. Protective role of antioxidative food factors in oxidative stress caused by hyperglycemia. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043: 440-51.
- Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 2005;59: 365-73.
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004;279: 42351-4.
- Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46: 1853-8.
- Sassa S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 1982;28: 133-45.

- Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, Bagatini M, Martins CC, Abdalla FH, Daci da Silva Serres J, Zanini D, Vieira JM, Cardoso AM, Schetinger MR, Morsch VM. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie* 2012;94: 374-83.
- Sharma S, Kulkarni SK, Chopra K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33: 940-5.
- Souza JB, Rocha JB, Nogueira CW, Borges VC, Kaizer RR, Morsch VM, Dressler VL, Martins AF, Flores EM, Schetinger MR. Delta-aminolevulinic acid dehydratase (delta-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clin Biochem* 2007;40: 321-5.
- Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 2005;205: 1-16.
- Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2002;39: 117-22.
- Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 2003;29: 579-85.
- Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol* 2008;Chapter 5: Unit 5 47.
- Zobali F, Avci A, Canbolat O, Karasu C. Effects of vitamin A and insulin on the antioxidative state of diabetic rat heart: a comparison study with combination treatment. *Cell Biochem Funct* 2002;20: 75-80.

### Legends to figures

Figure 1 – Normal histological aspect of the liver, hematoxylin & eosin, (A) Control and (B) Control/Curcumin. 30 days after DM induction with STZ it was observed disaggregation of trabeculae in diabetic rats (C) (arrow head). Treatment with insulin (D) and insulin associated with curcumin (F) reverted the hepatic damage caused by diabetic state. Curcumin per se (E) was not able to prevent trabeculae disaggregation in diabetic rats (arrow head). Curcumin dose: 60mg/kg. Obj. 40x.

Figure 2 – Normal histological aspect of the kidney hematoxylin & eosin (A) Control and (B) Control/Curcumin. 30 days after DM induction with STZ it was observed vacuolization of tubular cells in diabetic rats (C) (arrow head). Treatment with insulin (D) and insulin associated with curcumin (F) reverted the renal damage caused by diabetic state. Curcumin per se (E) was not able to prevent vacuolization of tubular cells in diabetic rats (arrow head). Curcumin dose: 60mg/kg. Obj. 40x.

Figure 3 - Levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in serum (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means  $\pm$  S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). ANOVA-Duncan's Test.

Figure 4 - CAT activity in blood (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means  $\pm$  S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ;  $n=6$ ). ANOVA-Duncan's Test.

Figure 5 - SOD activity in blood (A), liver (B) and kidney (C) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means  $\pm$  S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.

Figure 6 -  $\delta$ -ALA-D activity in liver (A) and kidney (B) of STZ-induced diabetic rats and those treated with curcumin and/or insulin. Bars represent means  $\pm$  S.D. Groups with different letters are statistically different ( $P < 0.05$ ;  $n = 6$ ). ANOVA-Duncan's Test.

**Legend to tables**

Table 1 – Body weight and blood glucose levels in control and STZ-induced diabetic rats treated with curcumin 60mg/kg and/or insulin at the onset and at the end of the experiment.

Table 2 - Hepatic and renal markers of STZ-induced diabetic rats treated with curcumin 60mg/kg and/or insulin.

Figure 1

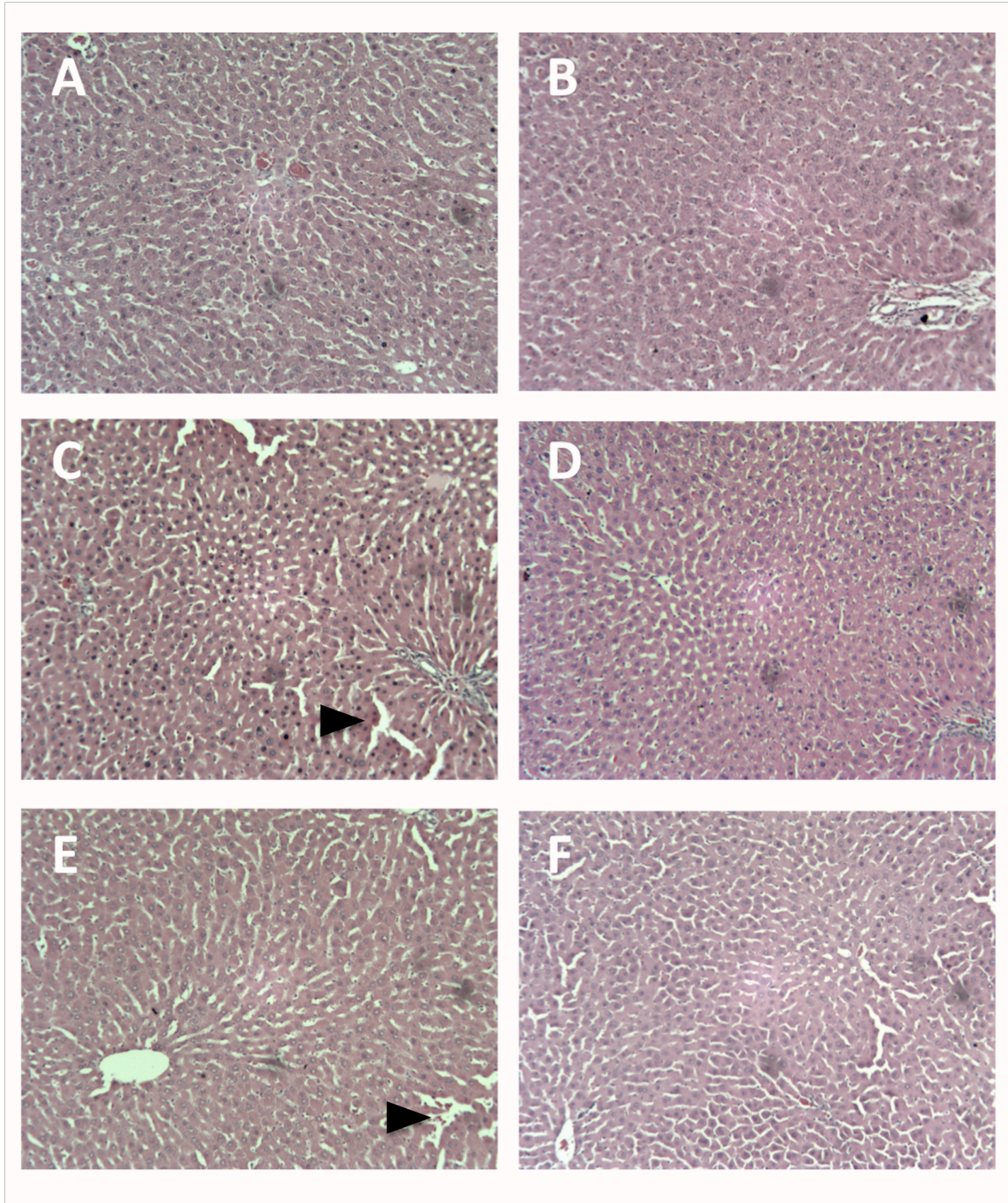




Figure 2

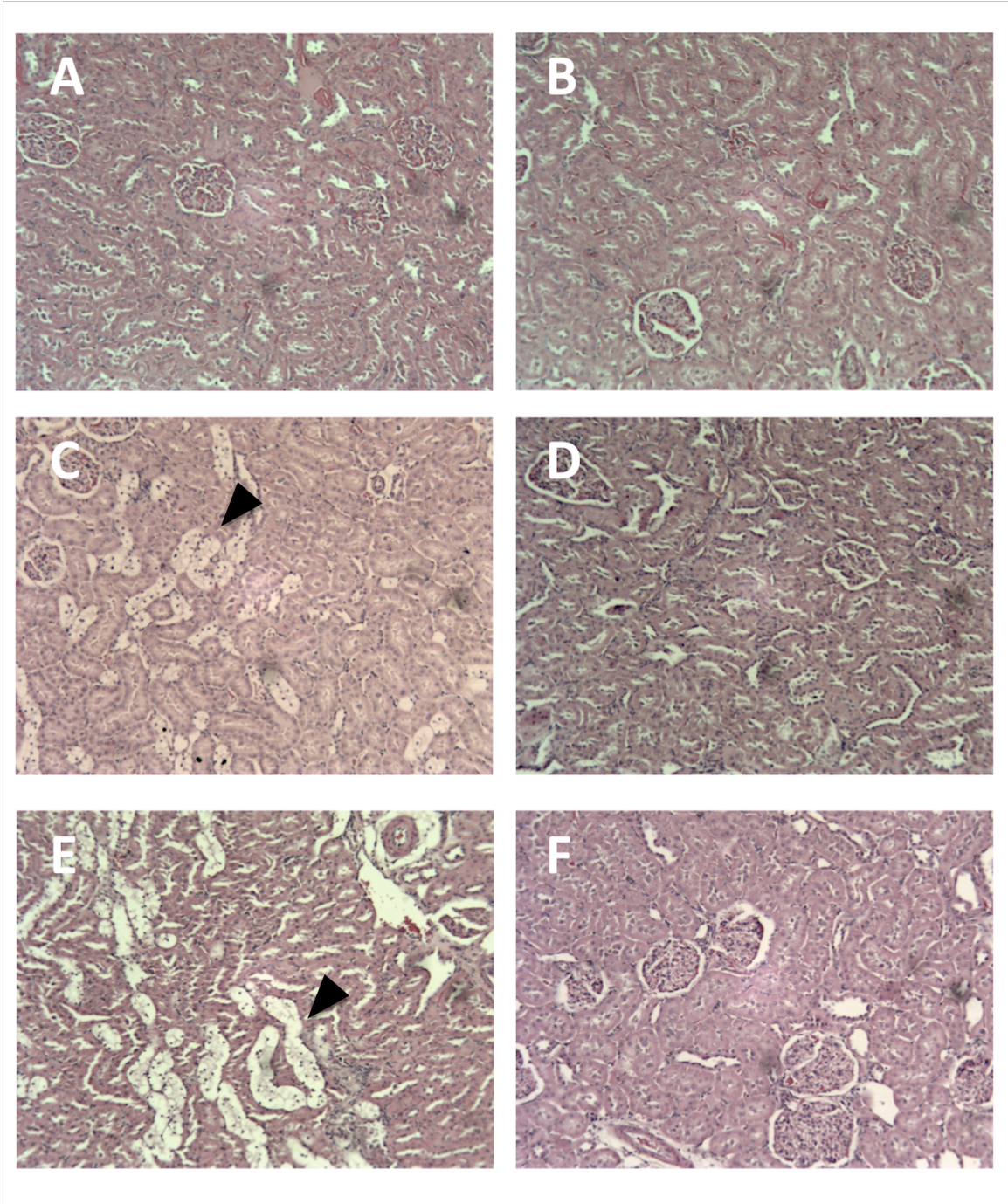


Figure 3

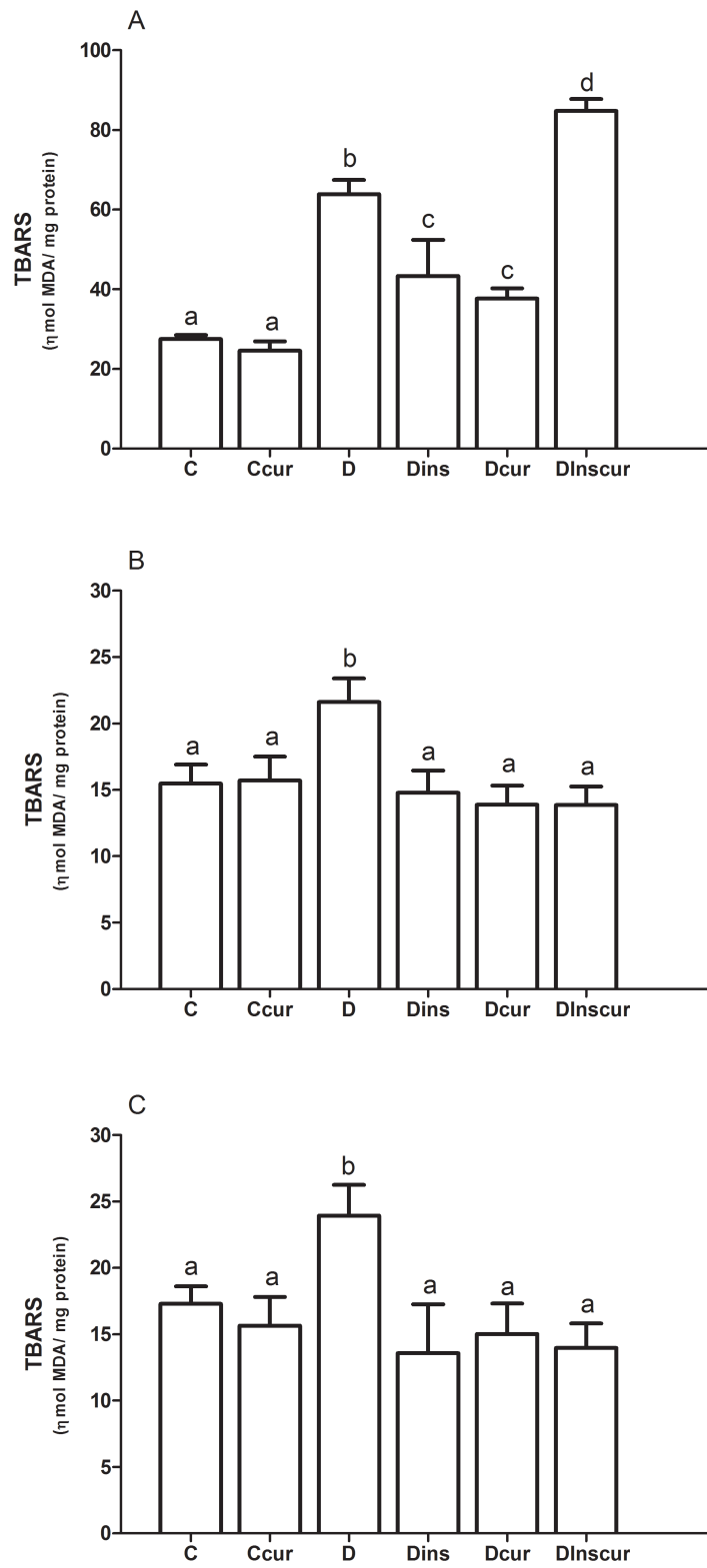


Figure 4

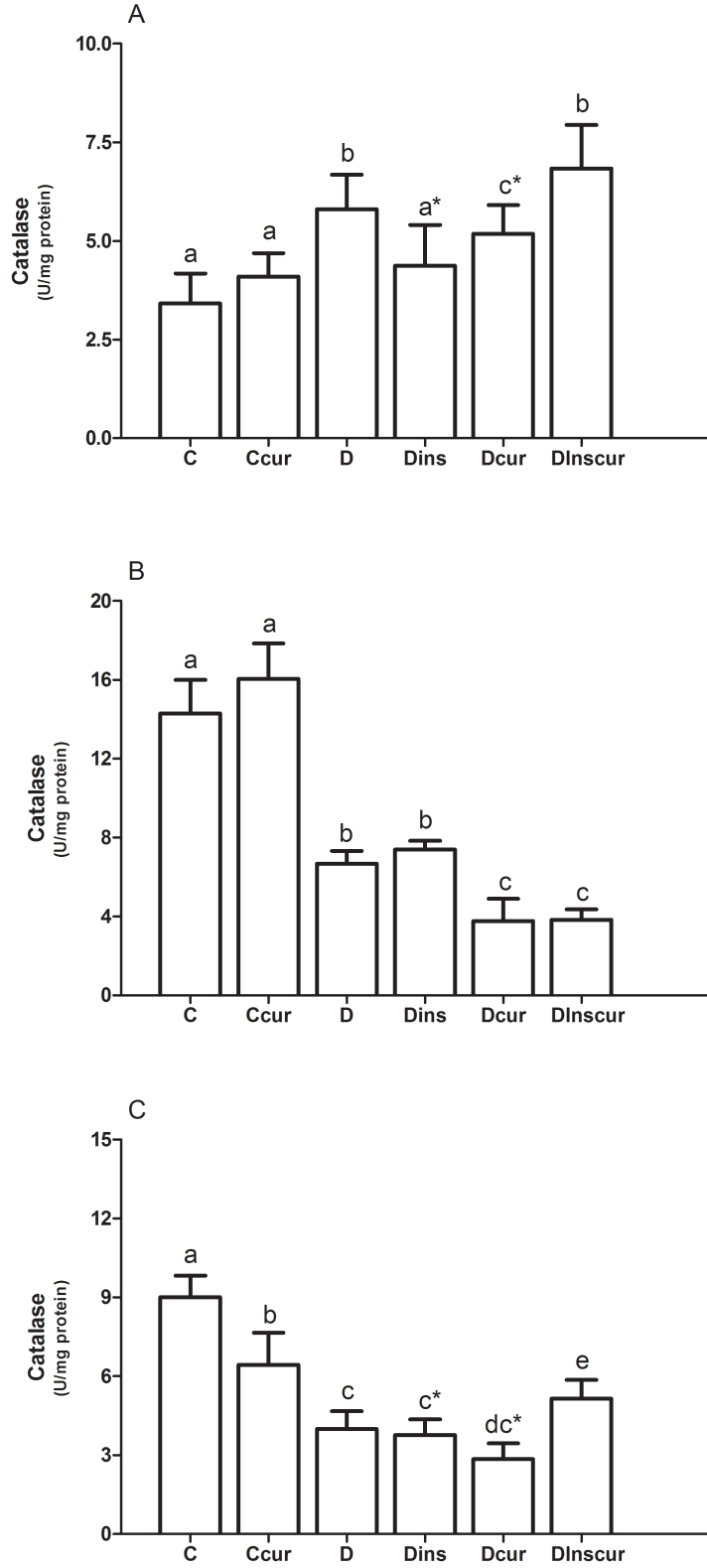


Figure 5

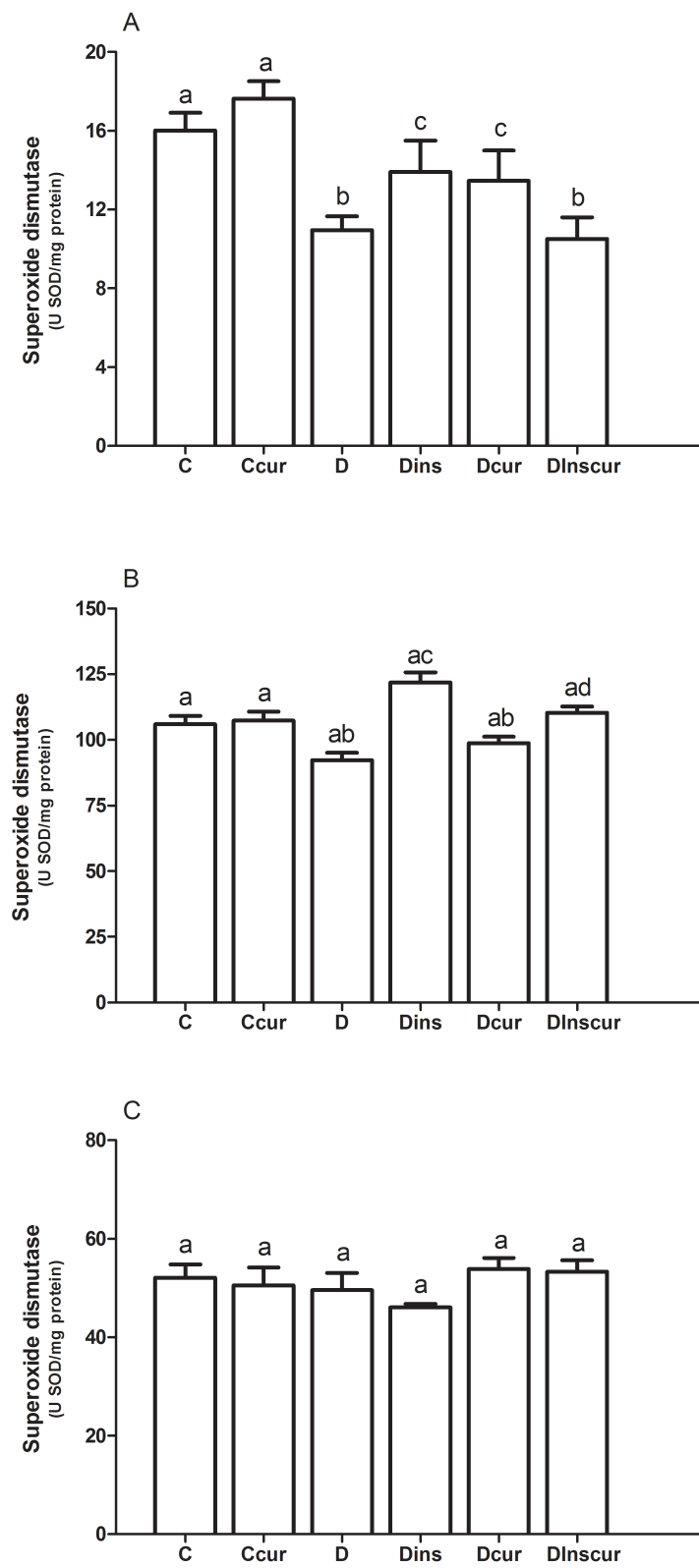


Figure 6

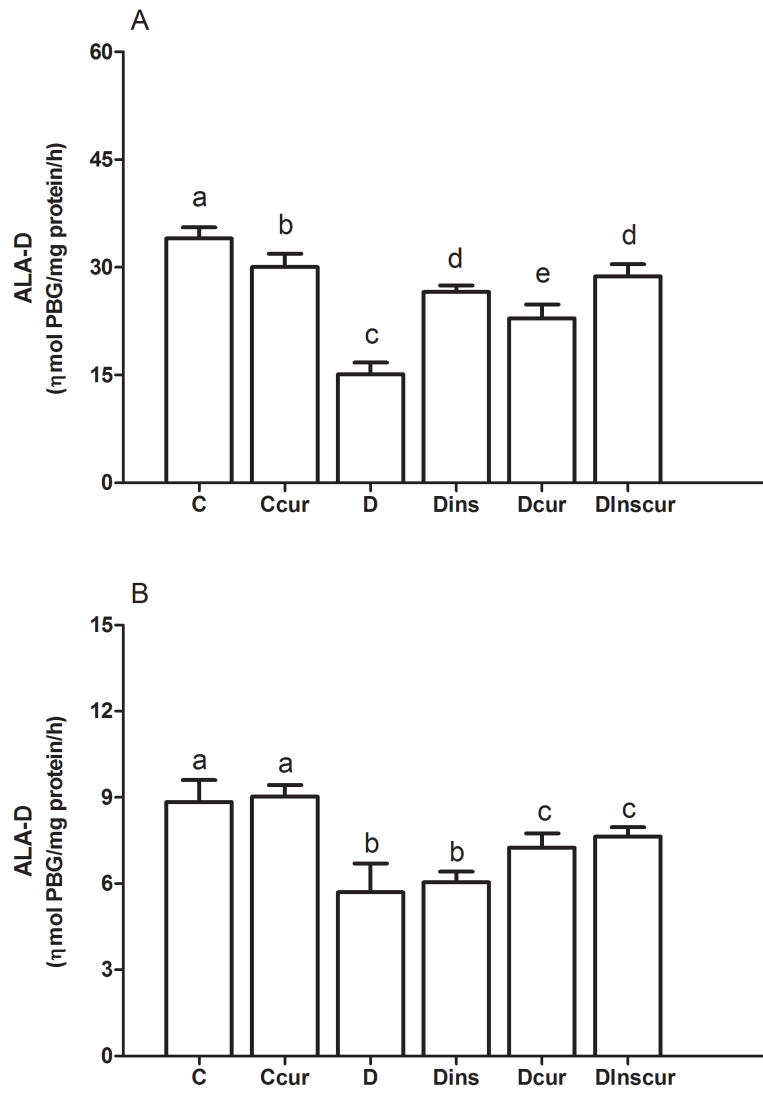


Table 1

Groups	Blood Glucose levels (mg/dL)		Body weight (g)	
	Onset	End	Onset	End
C	86,80± 2.63	102.60± 2.72	273 ± 2.95	352.60± 4.39*
CCur	80.60± 1.90	95.80± 2.32	235.40 ± 2.18	322.40± 4.55*
D	431.00± 6.57	590.60± 3.58*	292.60± 2.82	180.60± 3.27*
DIns	459.00± 5.34	226.20± 2.75*	271.20± 4.92	338.40± 4.76*
DCur	468.60± 6.70	575.60± 4.95*	288.60± 3.77	214.40± 3.27*
DInsCur	438.80± 5.50	258.20± 5.14*	263.80± 3.72	318.40± 4.10*

Values are expressed as mean ± S.D. \*Significant difference when compared to the onset of the same group (P<0.05, n=6). C: Control; CCur: Control/Curcumin; D: Diabetic; DIns: Diabetic/Insulin; DCur: Diabetic/Curcumin; DInsCur: Diabetic/Insulin/Curcumin. Curcumin dose: 60mg/kg.

Table 2

Groups	ALT (U/l)	AST (U/l)	$\gamma$ -GT (U/l)	Creatinine (md/dl)
C	61.59 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	146.61 $\pm$ 3.93 <sup>a</sup>	12.67 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
CCur	62.01 $\pm$ 2.52 <sup>a</sup>	156.70 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup>	11.56 $\pm$ 1.30 <sup>a</sup>	0.63 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>
D	276.22 $\pm$ 4.25 <sup>b</sup>	374.66 $\pm$ 4.90 <sup>b</sup>	20.95 $\pm$ 1.72 <sup>b</sup>	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
DIns	66.52 $\pm$ 4.13 <sup>a</sup>	185.76 $\pm$ 2.98 <sup>a</sup>	12.81 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	0.73 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
DCur	123.64 $\pm$ 3.39 <sup>c</sup>	385.86 $\pm$ 7.39 <sup>c</sup>	18.15 $\pm$ 1.70 <sup>c</sup>	0.70 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>
DInsCur	71.23 $\pm$ 2.39 <sup>a</sup>	141.97 $\pm$ 3.68 <sup>d</sup>	12.03 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	0.75 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>

Data are expressed as means  $\pm$  S.D. Different letters in the same column indicate differences among the groups. (P<0.05; n=6) ANOVA-Duncan's test. ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase;  $\gamma$ -GT:  $\gamma$ -glutamyltransferase; C: Control; CCur: Control/Curcumin; D: Diabetic; DIns: Diabetic/Insulin; DCur: Diabetic/Curcumin; DInsCur: Diabetic/Insulin/Curcumin. Curcumin dose: 60mg/kg.

### 3 CONCLUSÃO

O tratamento com curcumina e/ou insulina preveniu o estresse oxidativo no sangue de ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina, através da modulação das defesas antioxidantes enzimáticas. O uso isolado de curcumina e insulina foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica no soro, fígado e rins, sugerindo um efeito protetor destes compostos frente ao dano oxidativo provocado pelo estado diabético. Também pode-se concluir que a atividade da  $\delta$ -ALA-D pode ser usada como parâmetro de estresse oxidativo, uma vez que sua atividade estava reduzida em ratos diabéticos e o tratamento com curcumina e/ou insulina preveniu sua inibição nos tecidos hepático e renal. Com esta investigação, foi possível demonstrar a importância do uso da insulina como tratamento de eleição do DM, visto que este fármaco foi capaz de prevenir danos celulares e preservar a arquitetura tecidual hepática e renal de ratos diabéticos. Este estudo contribui para a compreensão de que os antioxidantes provenientes de plantas medicinais, como a curcumina, devem ser utilizados como adjuvantes no tratamento do diabetes *mellitus* e não como terapia isolada.



## 4 PERSPECTIVAS

Este estudo mostrou o efeito protetor da curcumina e da insulina sobre os parâmetros de estresse oxidativo no sangue, fígado e rins de ratos diabéticos tratados com estes compostos. Poderíamos aprofundar ainda mais este estudo a partir da concretização dos seguintes objetivos:

- Analisar os parâmetros de estresse oxidativo no sistema nervoso central dos ratos diabéticos a fim de avaliar uma possível proteção da curcumina em uma das complicações secundárias do DM.
- Realizar testes comportamentais em ratos tratados com os compostos analisados neste estudo.
- Avaliar as alterações na atividade das enzimas NTPDase e AChE em sangue e linfócitos de animais diabéticos induzidos com estreptozotocina e tratados com curcumina e insulina.
- Avaliação imunohistoquímica do pâncreas de ratos diabéticos tratados com insulina e curcumina.

## REFERÊNCIAS

ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Implications of the diabetes control and clinical trial. **Diabetes**, v.42, p.1555-1558, 1993.

ADA – AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.34, s.1, p.62-69, 2011.

ADA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes – 2012. **Diabetes Care**, v.35, s.1, p.11-63, 2012.

AGGARWAL, B.B.; HARIKUMAR, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, n.1, p.40-59, 2009.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and mother nature. **Biochemical Pharmacology**, v.76, p.1590-1611, 2007.

ATKINSON, M.A.; MACLAREN, N.K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v.331, n.21, p.1428-1436, 1994.

BABIOR, B.M. Superoxide: a two-edged sword. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.2, p.141-155, 1997.

BABU, P.; SRINIVASAN, K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*) in streptozotocin induced diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.166, p.169-175, 1997.

BABU, P.; SRINIVASAN, K. Amelioration of renal lesions associated with diabetes by dietary curcumin in streptozotocin diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.181, p.87-96, 1998.

BARBOSA et al. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.6, p.940-950, 2008.

BASTOS, D.H.M. et al. Mecanismo de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, p.646-656, 2009.

BONNER-WEIR, S. Life and death of the pancreatic  $\beta$  cells. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.11, n.9, p.375-378, 2000.

BRITO, V.B. et al. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity in mice. **Nutrition**, v.23, p.818-826, 2007.

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v.54, p.1615-1625, 2005.

CERIELLO, A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. **Diabetes Care**, v.26, n.5, p.1589-1596, 2003.

DANEMAN, D. Type 1 diabetes. **Lancet**, v.367, p.847-858, 2006.

DELBIN, M.A. Role of exercise training on pulmonary ischemia/reperfusion and inflammatory response. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.24, n.4, p.552-561, 2009.

EL-SERAG, H.B. et al. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v.126, n.2, p.460-468, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FERNÁNDEZ-CUARTERO, B. et al. Delta aminolevulinate dehydratase (ALA-D) activity in human and experimental diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry &**

**Cell Biology**, v.31, p.479-488, 1999.

GIUGLIANO, D. et al. Oxidative stress and diabetic vascular complications. **Diabetes Care**, v.19, n.3, p.257-267, 1996.

GROSS, J.L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.46, n.1, p.16-26, 2002.

GUTIERRES, V.O. et al. Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. **British Journal of Nutrition**, v.108, n.3, p.440-448, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HAMDEN, K. et al. Combined vitamins (C and E) and insulin improve oxidative stress and pancreatic and hepatic injury in alloxan diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.63, p.95-99, 2009.

HATCHER, H. et al. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.65, p.1631-1652, 2008.

HU, F.B. Globalization of diabetes. The role of diet, lifestyle, and genes. **Diabetes Care**, v.34, p.1249-1257, 2011.

IMAGAWA, A. et al. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. **The New England Journal of Medicine**, v.342, n.5, p.301-307, 2000.

INZUCCHI, S.E.; SHERWIN, R.S. Diabetes mellitus tipo 1. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. **Cecil Tratado de Medicina Interna**, 23ed. Rio de Janeiro:Elsevier, v.2, cap. 247, p.1988-2013, 2010a.

INZUCCHI, S.E.; SHERWIN, R.S. Diabetes mellitus tipo 2. In: GOLDMAN,L.; AUSIELLO, D. **Cecil Tratado de Medicina Interna**, 23ed. Elsevier, v.2, cap.248, p.2013-2028, 2010b.

JAIN, S. et al. Effect of curcumin on protein glycosylation lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. **Free Radical Biology and Medicine**, v.41, p.92-96, 2006.

JAQUES, J.A.S. **Efeito da curcumina sob a atividade das enzimas NTPDase e acetilcolinesterase em linfócitos de ratos expostos à fumaça do cigarro**. 2010. 120p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

KUNCHANDY, E.; RAO, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. **International Journal of Pharmacology**, v.58, p.237-240, 1990.

LAAKSO, M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes: challenge for treatment and prevention. **Journal of Internal Medicine**, v.249, p.225-235, 2001.

MAIA, N.B. et al. Influência dos tipos de rizoma de multiplicação no crescimento da curcuma. **Bragantia, Campinas**, v.54, n.1, p.33-37, 1995.

MAIESE, K. et al. Oxidative stress biology and cell injury during type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Current Neurovascular Research**, v.4, n.1, p.63-71, 2007.

MARITIM, A.C. et al. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.17, n.1, p.24-38, 2003.

MEGHANA, K. et al. Curcumin prevents streptozotocin-induced islets by scavenging free radicals: a prophylactic and protective role. **European Journal of Pharmacology**, v.577, n.1-3, p.183-191, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012. **Portal da Saúde**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=29793&janela=1)

MURUGAN, P.; PARI, L. Influence of tetrahydrocurcumin on lipid peroxidation and lipids in streptozotocin-nicotinamide-induced-diabetic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.99, p.122-127, 2006.

MURUGAN, P.; PARI, L. Influence of tetrahydrocurcumin on erythrocyte membrane bound enzymes and antioxidant status in experimental type 2 diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, n.3, p.479-486, 2007a.

MURUGAN, P.; PARI, L. Influence of tetrahydrocurcumin on hepatic and renal functional markers and protein levels in experimental type 2 diabetic rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.101, p.241-245, 2007b.

NATHAN, D.M. Long-term complications of diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v.328, n.23, p.1676-1685, 1993.

NDISANG, J.F.; JADHAN, A. Heme oxygenase system enhances insulin sensitivity and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetes. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v.296, p.829-841, 2009.

NISHIYAMA, T. et al. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa* L) suppress and increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-Ay mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.959-963, 2005.

RAHIMI, R. et al. A review of the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, n.7, p.365-373, 2005.

RAND, J. et al. Canine and feline diabetes mellitus: nature or nurture? **The Journal of Nutrition**, v.134, p.2072s-2080s, 2004.

REIS, J.S. et al. Estresse oxidativo: Revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, n.7, p.1096-1105, 2008.

SASSA, S. ALAD porphyria. **Seminars in Liver Disease**, v.18, p.95-101, 1998.

SCHMATZ, R. et al. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, v.94, p.374-383, 2012.

SHARMA, S. et al. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.33, n.10, p.940-945, 2006.

SOUZA, J.B. et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clinical Biochemistry**, v.40, p.321-325, 2007.

SRIVASTAVA, R.M. et al. Immunomodulatory and therapeutic activity of curcumin. **International Immunopharmacology**, v.11, n.3, p.331-340, 2011.

SURYANARAYANA, P. et al. Curcumin and turmeric delay streptozotocin-induced diabetic cataract in rats. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v.46, n.6, p.2092-2099, 2005.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VIGITEL BRASIL. **Dados sobre diabetes**, 2011. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Mai/09/Vigitel\\_2011\\_diabetes\\_final.pdf](http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Mai/09/Vigitel_2011_diabetes_final.pdf)

WU, K.K; HUAN, Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. **Current Protocols in Pharmacology**, v.40, p.1-5, 2008.

ZHOU, H. et al. Targets of curcumin. **Current Drug Targets**, v.12, n.3, p.332-347, 2011.