

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

**O ANTIOXIDANTE QUERCETINA DIMINUI O ESTRESSE  
OXIDATIVO HEPÁTICO EM RATOS DIABÉTICOS**

**ALEXANDRE SIMÕES DIAS**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> NORMA POSSA MARRONI**

TESE APRESENTADA NO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS : FISILOGIA..

**Porto Alegre  
2005**

POEMINHA DO CONTRA

*Todos estes que aí estão  
Atravancando o meu caminho,  
Eles passarão.  
Eu passarinho!*

*Mário Quintana*

*Adriane, és exemplo de companheira, amiga e mulher.  
Este é o resultado de meu trabalho científico,  
que não seria realizado sem a tua presença.  
Obrigado por acreditar e confiar em mim.*

## AGRADECIMENTOS

---

Aos meus pais, Antônio Paulo Simões Dias e minha mãe Gisela Maria Superti Dias pelo exemplo de dedicação e por terem me ensinado o que é mais precioso na pessoa humana, a educação.

Às minhas irmãs Ana Paula e Rosângela, o amor e a alegria que possuem contagia a todos e apesar de estarem distante estiveram sempre comigo.

Ao Centro Universitário Metodista-IPA, em especial à coordenadora do curso de fisioterapia, Adriana Raffone.

Aos meus amigos e colegas, Alan Silveira e Mariane Monteiro, pelo companheirismo e amizade.

Ao Dr. Cláudio Augusto Marroni, pelo apoio científico e pelas incansáveis críticas, sempre muito fundamentadas e pela árdua revisão desta pesquisa.

À funcionária do laboratório de Fisiologia Digestiva Maria Inês Rodrigues, uma presença amiga, constante e eficiente, é importante para nós, mesmo não estando presente.

Aos meus colegas de Laboratório de Fisiologia Digestiva, Maria Amália Pavanato, Henrique Fillmann, Josino Brasil, Rafael Vercelino, Juliana Tieppo, Silvia Bona, Nelson, Dr<sup>a</sup>. Marilene Garrido, pelo companheirismo e pelo auxílio no decorrer do trabalho. Sem a ajuda de vocês não teria iniciado e finalizado esta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos espanhóis do departamento de Fisiologia da Universidade de Leon, Dr. José Luiz Mauriz Gutierrez, Dra. Pillar Sánchez-Collado, Maria Alonzo, Dra. Maria José Cuevas, Dra. Sonia Sanchez-Campos e em especial ao prof. Dr. Javier Gonzalez-Gallego, pelo estímulo científico e pela possibilidade de contribuir com meu crescimento profissional.

Querida professora, amiga e orientadora Norma Marroni, creio que agora, posso chamar-lhe carinhosamente de “Tia Norma”. Muito obrigado pela oportunidade profissional que me proporcionou. Com certeza, a conquista de meu doutorado ocorre porque esteve ao meu lado, incentivando, apoiando, criticando, mas nunca deixando de demonstrar sua força de vontade, isto, é o que nos leva para as nossas vitórias. Foram 10 anos de convivência agradável e produtiva. Obrigado por tudo que fizeste por mim, este trabalho é somente uma pequena retribuição da minha parte.

Este trabalho de pesquisa foi realizado nas instalações do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, no Laboratório de Fisiologia Digestiva do Departamento de Fisiologia e com recursos concedidos pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação desta Universidade, através do convênio UFRGS/CAPES.

# SUMÁRIO

---

**ABREVIATURAS**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**SUMMARY**

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1 - Diabetes Mellitus (DM).....	24
1.2 - Diabetes Mellitus experimental.....	27
1.3 - Formação das Espécies Ativas de Oxigênio e Nitrogênio.....	30
1.4 - Defesas Antioxidantes.....	34
1.4.1 - Antioxidantes enzimáticos.....	34
1.4.2 - Antioxidantes não-enzimáticos.....	36
1.5 - Antioxidantes e Diabetes Mellitus.....	37
1.6 - Flavonóides.....	39
1.7 - Quercetina.....	40
1.8 - Diabetes Mellitus, Estresse Oxidativo, Óxido Nítrico e Fator de Transcrição Nuclear.....	42
<b>2 - OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
2.1 - Objetivo Geral.....	48
2.2 - Objetivos Específicos.....	48
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>50</b>
3.1 - Animais.....	50
3.2 - Grupos Experimentais.....	50
3.2.1 - Formação dos grupos.....	50
3.3 - Marcação e Pesagem.....	51
3.4 - Procedimentos Experimentais.....	51

3.4.1 - Indução do DM.....	51
3.4.2 - Quercetina.....	52
3.4.3 - Obtenção do plasma e determinação da glicemia.....	52
3.5 - Sacrifício dos Animais e Preparo do Homogeneizado.....	53
3.5.1 - Sacrifício dos animais.....	53
3.5.2 - Preparo do homogeneizado fresco.....	53
3.5.3 - Obtenção da fração citosólica.....	54
3.5.4 - Obtenção da fração mitocondrial.....	54
3.6 - Determinação do Estresse Oxidativo.....	54
3.6.1 - Quantificação das proteínas.....	54
3.6.2 - Avaliação da lipoperoxidação (LPO) .....	55
3.6.2.1 - Determinação dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	55
3.6.2.2 - Determinação da Quimiluminescência (QL).....	56
3.6.3 - Determinação das Enzimas Antioxidantes.....	57
3.6.3.1 - Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	57
3.6.3.2 - Atividade da catalase (CAT).....	57
3.6.3.3 - Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	58
3.6.4 - Determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) .....	59
3.6.5 - Ativação do NF- $\kappa$ B.....	59
3.6.6 Quantificação da proteína do IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ e da óxido nítrico sintase induzível (iNOS).....	61
3.6.7 - Estudo Histológico.....	63
3.7 - Análise Estatística.....	63
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1 - Peso Corporal e Glicose sangüínea.....	66
4.2 - Determinação do Estresse Oxidativo.....	67
4.3 - Atividade das enzimas antioxidantes.....	70
4.3.1 - Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	70
4.3.2 - Atividade da catalase (CAT) .....	71
4.3.3 - Atividade da glutathiona peroxidase (GPx).....	72

4.4 - Níveis citoplasmáticos de Glutathiona Reduzida (GSH), Oxidada (GSSG), e relação GSSG/GSH.....	73
4.5 - Ativação do Fator de Transcrição Nuclear kappa B (NF-κB).....	75
4.6 - Níveis Citoplasmáticos Hepáticos do Complexo IKK e IκBs.....	75
4.7 - Expressão Hepática da Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS) .....	75
4.8 - Estudo Histológico.....	79
<b>5 - DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6 - CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>8 – ARTIGO.....</b>	<b>112</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

% - percentual	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio
α - alfa	HRP- peroxidase de rábano
β - beta	HAS - Hipertensão Arterial Sistêmica
γ - gama	HDL colesterol – <i>high density lipoprotein</i> - lipoproteína de alta densidade
μL - microlitro	HGT - hemoglicoteste
μmol - micromolar	IκB-α - inibidor alfa do fator de transcrição nuclear kappa beta
< - menor	IκB-β - inibidor beta do fator de transcrição nuclear kappa beta
APS- persulfato de amônia	i.p. – intraperitoneal
°C – graus celsius	IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Ca <sup>2+</sup> - íons cálcio	IKK – complexo que ativa a fosforilação dos inibidores do fator de transcrição nuclear kappa beta
CAPE - ácido cafeico fenetil ester [ <i>caffeic acid phenethyl ester</i> ]	IKK-α - subunidade alfa do complexo IKK
CAT – enzima catalase	IKK-β - subunidade beta do complexo IKK
cm - centímetros	IKK-δ - subunidade gama do complexo IKK
cNOS – óxido nítrico sintase constitutiva	IL - interleucina
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	iNOS - enzima óxido nítrico sintase induzível
co - controle	KCl – cloreto de potássio
co+q - controle+quercetina	KDa - quilodaltons
cps - contas por segundo	Kg - kilogramas
CuZn-SOD – superóxido dismutase cobre-zinco	LDL colesterol - lipoproteína de baixa densidade
d.C. – depois de Cristo	L-NMMA - L-NG-monometil-arginina
db - diabéticos	LPO - lipoperoxidação
db+q - diabéticos+quercetina	MAC - moléculas de adesão celular
Dest - destilada	mg - miligramas
dL- decilitro	min - minuto
dl-dC – anticorpo anti dl-dC	Ministério da Saúde/Sistema Virtual em Saúde
DM - diabetes mellitus	mM - milimolar
DMID - diabetes mellitus insulino dependente	nmol - nanomol
DMNID – diabetes mellitus não insulino dependente	Mn-SOD – enzima superóxido dismutase manganês
DNA – ácido desirribonucleico	MtNOS - óxido nítrico sintase mitocondrial
DP – desvio padrão	mtSOD – enzima superóxido dismutase mitocondrial
DTT - ditioneitol	N - normalidade
EAN – espécies ativas de nitrogênio	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> - trióxido de dinitrogênio
EAO - espécies ativas de oxigênio	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase – bomba-sódio potássio ATPase dependente
EAON - espécies ativas de oxigênio e nitrogênio	NaCl – cloreto de sódio
EDTA – ácido etinodiaminotetracético	NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo
ELISA - <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>	NADP <sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
EMSA – <i>electrophoretic mobility shift assay</i>	NADPH - forma reduzida do nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial	NaHCO <sub>3</sub> – bicarbonato de sódio
Fe – ferro	NaOH – hidróxido de sódio
Fe <sup>++</sup> - íon ferroso	NF-κB - fator de transcrição nuclear kappa beta
Fe <sup>+++</sup> - íon férrico	
g - gramas	
GPx – enzima glutaciona peroxidase	
GRd - enzima glutaciona redutase	
GSH - glutaciona reduzida	
GSSG - glutaciona oxidada	
H <sup>+</sup> - íons hidrogênio	
H <sub>2</sub> O - água	

nm - nanômetro  
nNOS - óxido nítrico sintase neuronal  
NO- óxido nítrico  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - nitritos  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - nitratos  
NOS - enzima oxido nítrico sintase  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub> – oxigênio *singlet*  
O<sup>•</sup> - ânion radical superóxido  
OH<sup>•</sup> - radical hidroxil  
ONOO<sup>-</sup> - peroxinitrito  
OPAS - Organização Pan-americana de Saúde  
OPT - optalaldeído  
<sup>32</sup>P(ATP) - adenosina trifosfato marcado radioativamente com fósforo  
PBS- tampão salina-sulfato  
PMSF – fluoreto de fenil metilsulfonila  
PKA - proteína quinase A  
pmoles - picomoles  
PNK - T4 polinucleotídeo quinase  
QL Máx – quimiluminescência máxima  
QL Min – quimiluminescência mínima  
QL -quimiluminescência  
RE - retículo endoplasmático

ROOH – hidroperóxido alquil  
rpm – rotações por minuto  
SDS – solução de dodecil sulfato de sódio  
SIM - Sistema de Informações de Mortalidade  
SOD - enzima superóxido dismutase  
STZ - estreptozotocina  
SUS - Sistema Único de Saúde  
TBARS – substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico  
TBE – tris-acidoclórico EDTA  
t-BOOH - hidroperóxido de tert-butila  
TCA – ácido tricloroacético  
TE – Tampão TRIS/EDTA  
TEMED – tertametil-etilclorodimida  
TRIS- pó trisma; tampão de extração  
HPLC – *high performance liquid chromatography*  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral alfa  
TRX - tioredoxina  
U/mL – unidade por milimolar  
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
V – volts

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b>	Efeito da hiperglicemia na formação da proteína glicosilada e da auto-oxidação da glicose.....	26
<b>Figura 2</b>	Atuação da estreptozotocina nas células beta pancreáticas.....	29
<b>Figura 3</b>	Mecanismo da destruição das células pancreáticas na indução do DM através da administração de estreptozotocina e aloxano.....	30
<b>Figura 4</b>	Decomposição do ânion superóxido gerado na mitocôndria e no citosol e atuação enzimática .....	36
<b>Figura 5</b>	Estrutura química da quercetina.....	41
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática da ativação do NFκ-B e sua integração com os fatores envolvidos no diabetes mellitus.....	45
<b>Figura 7</b>	Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	68
<b>Figura 8</b>	Medida da quimiluminescência (QL).....	69
<b>Figura 9</b>	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	70
<b>Figura 10</b>	Atividade da enzima catalase (CAT).....	71
<b>Figura 11</b>	Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx).....	72
<b>Figura 12</b>	Conteúdo de glutathione reduzida (GSH).....	73
<b>Figura 13</b>	Conteúdo de glutathione oxidada (GSSG).....	73
<b>Figura 14</b>	Relação da glutathione oxidada (GSSG) pela glutathione reduzida (GSH).....	74
<b>Figura 15</b>	Ativação do fator de transcrição nuclear kappa B.....	76
<b>Figura 16</b>	Análise das proteínas do complexo IKK e do IκBs.....	77
<b>Figura 17</b>	Expressão da iNOS no tecido hepático.....	78
<b>Figura 18</b>	Histologia do grupo controle.....	79
<b>Figura 19</b>	Histologia do grupo controle+quercetina.....	79

<b>Figura 20</b>	Histologia do grupo diabético.....	79
<b>Figura 21</b>	Histologia do grupo diabético+quercetina.....	79

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1** Taxa de mortalidade específica por Diabetes Mellitus no ano de 2002 ..... 23
- Tabela 2** Peso corporal e concentração da glicose sangüínea nos diferentes grupos estudados ..... 67

## **RESUMO**



## RESUMO

---

**Introdução:** O diabetes mellitus (DM) é uma doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo, e, estudos experimentais e clínicos, sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na patogênese e na progressão da mesma.

**Objetivo:** Este estudo tem como objetivo investigar os efeitos do antioxidante quercetina administrado intraperitonealmente sobre o estresse oxidativo, a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática no modelo experimental de DM tipo I.

**Material e métodos:** Foram utilizados 32 ratos machos Wistar, divididos em quatro grupos de oito animais: controle, controle que receberam a quercetina, diabéticos não tratados e diabéticos tratados com quercetina. A dose utilizada da quercetina foi de 50 mg/Kg de peso corporal diariamente. O DM foi induzido por única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (70 mg/kg). Após oito semanas (60 dias), foi avaliado os marcadores do estresse oxidativo hepático através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e a quimiluminescência (QL). A atividade hepática das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx), bem como a ativação do NF- $\kappa$ B pelo método (*Electrophoretic Mobility Shift Assay – EMSA*) foram mensurados. Também foram

avaliados a expressão das quinases dos inibidores do NF- $\kappa$ B (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ), bem como os inibidores (I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$ ) e a iNOS hepática pela técnica do *Western blot*.

**Resultados:** A concentração da glicose sangüínea aumentou significativamente nos animais diabéticos e não diminuiu após a administração da quercetina. No tecido hepático dos animais diabéticos aumentou o TBARS, a QL, a atividade da SOD e da CAT, e no grupo diabético que recebeu a quercetina os valores diminuíram. O DM aumentou a ativação do NF- $\kappa$ B, os níveis do IKK- $\alpha$  e da iNOS, e diminuiu o I $\kappa$ B- $\alpha$ . Todos os valores foram atenuados quando administrado a quercetina, somente a atividade da GPx, do IKK- $\beta$  e I $\kappa$ B- $\beta$  não apresentou diferença entre os grupos estudados.

**Conclusão:** A quercetina inibiu o estresse oxidativo hepático, a ativação do NF- $\kappa$ B e a expressão da iNOS. O tratamento com o antioxidante quercetina parece inibir as vias sinalizadoras de transdução, podendo interferir na produção dos mediadores nóxios envolvidos no modelo experimental de DM.

**Palavras-chaves:** Diabetes Mellitus, Quercetina, Estresse Oxidativo, Fígado.

## **SUMMARY**

---

## SUMMARY

---

**Introduction:** Diabetes mellitus (DM) is an disease that presents high incidence and prevalence in the population in diverse parts of the world, and, experimental studies and clinical, suggest that oxidative stress is involved in pathogenesis and progression of the same.

**Objective:** This study it has as objective to investigate the effect of quercetin treatment on oxidative stress, the activation of the factor of nuclear transcription kappa B (NF- $\kappa$ B) and hepatic expression of inducible nitric oxide sintase (iNOS) in the experimental model of DM type I.

**Material and methods:** Male rats Wistar had been used, divided in four groups with eight animals: control, control that had received quercetin, diabetic not treated and diabetic treated with quercetin. The used dose of quercetin was of 50 mg/Kg of corporal weight intraperitoneally (i.p.) daily. The DM was induced for i.p. injection of estreptozotocin (70 mg/kg). After eight weeks (60 days), it was evaluated the markers of oxidative stress hepatic through the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the chemiluminiscence (QL). The hepatic activity of antioxidants enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), as well as the activation of the NF- $\kappa$ B for the method (*Electrophoretic Mobility Shift Assay* - EMSA) had been measured. Also they had been evaluated the expression of quinases of

inhibitors of the NF- $\kappa$ B (IKK- $\alpha$  and IKK- $\beta$ ), as well as inhibitors (I $\kappa$ B- $\alpha$  and I $\kappa$ B- $\beta$ ) and iNOS for the *Western blot*.

**Results:** Blood glucose concentration increased significantly in the diabetic animals and did not decreased after administration of quercetin. In hepatic tissue of diabetic animals increased the TBARS, the QL, the activity of the SOD and the CAT, and in the diabetic group that received the quercetin the values had diminished. The DM increased the activation of the NF- $\kappa$ B, the levels of the IKK- $\alpha$  and iNOS, and decreased the I $\kappa$ B- $\alpha$ . All the values had been attenuated when used the quercetin, only the activity of the GPx, the IKK- $\beta$  and I $\kappa$ B- $\beta$  did not present difference between the studied groups.

**Conclusion:** The quercetin inhibited the hepatic oxidative stress, the activation of NF- $\kappa$ B and the expression of the iNOS. The treatment with the antioxidant quercetin seems to inhibit the signal transduction pathway, may block the production of noxious mediators involved in the experimental model of DM.

**KEY WORDS:** Diabetes Mellitus, Quercetin, Oxidative Stress, Liver.

# **INTRODUÇÃO**

---

## 1 - INTRODUÇÃO

---

O diabetes mellitus (DM) é uma doença que apresenta elevada incidência e prevalência na população em diversas partes do mundo, principalmente nos Estados Unidos e em países da Europa onde a prevalência é de aproximadamente 8%. Estima-se que existam mais de 100 milhões de casos de DM em todo o mundo. É uma doença que acomete diversos sistemas corporais com complicações freqüentes, decorrentes das alterações teciduais e vasculares, manifestando-se através da doença vascular periférica, doença isquêmica cardíaca e doenças cerebrovasculares (NATHAN et. al., 1997).

No Brasil, segundo dados do Sistema de informação do DM e Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) - (Hipertensão) do Ministério da Saúde, estima-se a existência de 6 milhões de diabéticos, metade dos quais faz acompanhamento nas unidades de básicas do Sistema Único de Saúde (SUS). O Ministério da Saúde, em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e com as Secretarias Estaduais de Saúde, realizou um inquérito, entre os anos de 1987 e 1989, e demonstrou que 7,6% da população com idade de 30 a 69 anos e 17,4% de 60 a 69 anos apresentavam DM. Juntamente com a HAS, o DM constitui-se em um dos principais fatores de risco para as doenças do aparelho circulatório. No ano de 2000, as doenças do aparelho circulatório foram responsáveis por 15,2% de internações realizadas no SUS em pacientes de 30 a 69 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

De 1986 a 1988, foram avaliados em nove capitais brasileiras os conhecimentos dos cidadãos sobre o DM, e 46% dos entrevistados não sabiam que eram diabéticos, e a prevalência da doença foi maior nas regiões mais industrializadas do país, Sudeste e Sul (MALERBI, et. al., 1992). Estudo realizado por Mathias e Jorge (2004) avaliou a mortalidade e a morbidade hospitalares numa população de idosos do município paranaense de Maringá, com 288.653 habitantes. Entre os anos de 1979 e 1998, a mortalidade proporcional por DM aumentou 16%, e o coeficiente de mortalidade passou de 72 para 137,6 óbitos por 100.000 habitantes, aumentando 147,8% no sexo

masculino e 61,9% no feminino, sendo mais importante em idosos com mais de 80 anos. Nas internações causadas por doenças endócrinas, nutricionais e metabólicas, aproximadamente 60% foram por DM, 30% para homens e 70% para mulheres (MATHIAS, et. al., 2004).

Dados de 2002, apresentados pelo Ministério da Saúde, demonstram que o estado do Rio Grande do Sul apresenta uma elevada taxa de mortalidade específica em decorrência do DM (24,81), ficando somente atrás do estado do Rio de Janeiro (36,83) e de Pernambuco (28,95). Os dados podem ser melhor visualizados na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Taxa de mortalidade específica por Diabetes Mellitus no ano de 2002.

Unidade Federativa	Taxa	Unidade Federativa	Taxa
Rondônia	15,23	Sergipe	24,62
Acre	14,08	Bahia	18,69
Amazonas	10,30	Minas Gerais	17,05
Roraima	18,18	Espírito Santo	19,79
Pará	9,46	Rio de Janeiro	36,83
Amapá	11,05	São Paulo	21,03
Tocantins	11,08	Paraná	24,04
Maranhão	10,98	Santa Catarina	19,18
Piauí	15,90	<b>Rio Grande do Sul</b>	<b>24,81</b>
Ceará	16,00	Mato Grosso do Sul	18,63
Rio Grande do Norte	20,59	Mato Grosso	18,74
Paraíba	20,41	Goiás	15,44
Pernambuco	28,95	Distrito Federal	18,03
Alagoas	21,23	<b>TOTAL</b>	<b>20,77</b>

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Taxa de mortalidade específica: óbitos por 100.000 habitantes.

Na cidade de Porto Alegre, a taxa de mortalidade específica para o ano de 2002 foi de 31,26. Estes dados evidenciam que o DM é uma doença com elevada mortalidade no Brasil, e que o estado do Rio Grande do Sul e a cidade de Porto Alegre estão entre as localidades de maior incidência.

Estes dados demonstram a necessidade do Estado do Rio Grande do Sul de desenvolver programas de promoção e proteção à saúde, visando orientar a população a adotar medidas profiláticas e terapêuticas que diminuam as taxas de mortalidade e melhorem a qualidade de vida.

### **1.1- DIABETES MELLITUS (DM)**

As células do organismo necessitam de energia para se manterem vivas, e para realizar inúmeras reações intra e extracelulares. O ciclo metabólico inicia-se na ingestão e na absorção dos nutrientes. A partir daí, a energia será estocada nos grandes “reservatórios” corporais, fígado e tecido adiposo. O tecido hepático estoca a glicose absorvida sob a forma de glicogênio hepático e, com gasto energético aumentado no metabolismo corporal, o glicogênio hepático é degradado na forma de moléculas de glicose, que são liberadas na circulação e utilizadas pelas células que as necessitam.

O tecido adiposo contribui na formação de energia através da liberação dos ácidos graxos e glicerol, a partir da degradação dos triglicerídeos. Este processo é denominado de lipólise e ocorre por intermédio da ação da enzima lipase (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004).

Todo o processo é iniciado pelo estímulo hormonal da insulina, que induz um aumento intracelular do 2º mensageiro a Adenosina Monofosfato Cíclico (AMP cíclico), que ativa a proteína quinase A (PKA), que por sua vez ativa a enzima lipase. A lipase ativada hidrolisa os triglicerídeos armazenados em glicerol e ácidos graxos que liberados na circulação podem ser utilizados por diferentes tecidos corporais. O glicerol, depois de fosforilado e oxidado, se isomeriza e ingressa na via glicolítica, seja para formar glicose (gliconeogênese) ou para se transformar em piruvato, e participam das reações do ciclo de Krebs. Os ácidos graxos são transportados, ligados à albumina, e

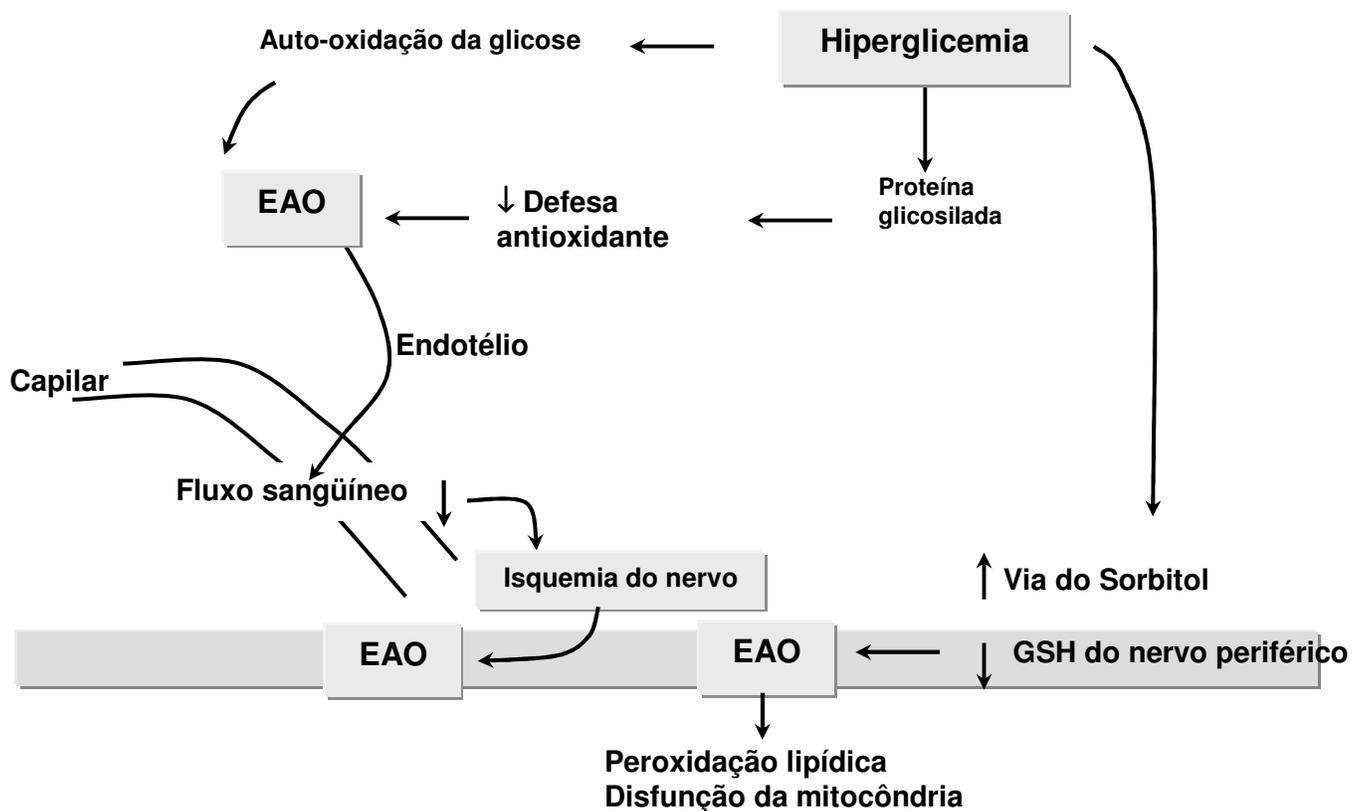
podem ser oxidados em uma série de reações, até participarem da  $\beta$ -oxidação (CINGOLANI e HOUSSAY, 2004).

O perfeito funcionamento dessa maquinaria metabólica, para a glicose entrar na célula e participar no processo de formação da energia celular, depende da insulina sangüínea que se liga a um receptor de membrana celular específico e aumenta o transporte da glicose sangüínea para o interior celular. Ao existir alguma alteração na ligação insulina-receptor, não haverá uma adequada entrada de glicose no interior celular, como nos diabéticos, que, conforme o tipo tem redução na secreção da insulina ou alteração na sinalização intracelular, posterior à ligação insulina-receptor (GALBO, 1988).

A definição do DM está baseada em critérios descritos por Harris e Cahill (1978) e se divide em duas classes: DM tipo I ou insulino-dependente, caracterizado pela deficiência das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas em produzir a insulina, e DM tipo II ou não insulino-dependente, que se caracteriza por uma resistência na captação da glicose sangüínea (HARRIS e CAHILL, 1978).

O DM, conhecido por afetar seres humanos desde os tempos antigos, foi descrito como a doença que culminava em conseqüências calamitosas. Arateus (81-138 d.C.) escreveu sobre a “maravilhosa” natureza da doença, que consistia em “desfazer o corpo em urina”, e era acompanhada por uma terrível sede que não podia ser saciada. A concentração abundante de glicose carregada pela urina deu a doença seu nome. *Diabetes* refere-se ao fluxo de fluido através do sifão, e *mellitus* vem da palavra mel. Na idade média, o DM era conhecido como “a doença da má urina” (SILVERTHORN, 2003).

Diversos fatores podem estar envolvidos nos mecanismos responsáveis pelas alterações metabólicas decorrentes do DM, e a hiperglicemia se destaca como a principal alteração clínica, pois contribui para o aumento nas ligações da glicose circulante com as proteínas sangüíneas (principalmente a albumina), o qual é denominada glicosilação não enzimática (BAYNES, 2003), bem como com a auto-oxidação da glicose (WOLFF e DEAN, 1987; WOLFF, et. al., 1991). **Figura 1.**



**FIGURA 1-** Efeito da hiperglicemia na formação da proteína glicosilada e da auto-oxidação da glicose, bem como a formação das espécies ativas de oxigênio (EAO) e o aumento da via do sorbitol. GSH-glutationa reduzida. (Adaptado de VAN DAM, 2002)

A imunidade celular está alterada nos pacientes com DM, pois a doença diminui a função dos leucócitos polimorfonucleares, a aderência leucocitária, bem como a quimiotaxia e a fagocitose. O principal fator responsável parece ser a acidose metabólica presente no DM (DELAMAIRE, et. al., 1997; GALLACHER, et. al., 1995).

Disfunções vasculares também podem estar presentes em pacientes com DM, tipos I e II, pois as células endoteliais são estimuladas diretamente pela hiperglicemia ou pela glicosilação avançada final, a expressarem em sua superfície de membrana moléculas de adesão celular (MAC), que por sua vez são ativadas pelas citocinas circulantes, pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e pelo aumento nos níveis de interleucina 1 (IL-1) (BAUMGARTNER-PARZER, et. al., 1995; SCHMIDT, et. al., 1995).

Tarik e colaboradores (1999) avaliaram marcadores de ativação celular endotelial, como a E-selectina e as moléculas de adesão intercelular, em crianças, adolescentes e adultos jovens com DM tipo I sem história prévia de doença vascular. Houve um aumento significativo nos níveis de E-selectina quantificado pelo método

ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e nas moléculas de adesão celular intercelular nos pacientes com DM ao serem comparados com o grupo controle (TARIK, et. al., 1999)

Recentemente, Meigs e colaboradores (2004) publicaram estudo com metodologia semelhante à de Tarik e colaboradores, diferindo somente no gênero e no tipo de DM. O resultado mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação dos diabéticos com o grupo controle, principalmente em relação ao aumento nos marcadores endoteliais (MEIGS, et. al., 2004).

Essas investigações demonstram que em uma desordem metabólica, como no DM, há maior formação de marcadores inflamatórios da disfunção endotelial, o que contribui para o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica, independentemente do DM ser I ou II. Um dos possíveis responsáveis por essa alteração tecidual é o estresse oxidativo, que será avaliado no presente estudo.

## **1.2- DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL**

Diversos modelos animais, utilizados no estudo do DM experimental, contribuíram para melhorar o entendimento das causas, conseqüências e tratamento da doença. As alterações metabólicas envolvendo um modelo animal foi realizado quando o pâncreas de um cão foi retirado, produzindo uma condição clínica semelhante à apresentada por humanos. O mesmo modelo foi empregado por Frederick Banting e Charles Best na Universidade de Toronto no ano de 1921, a partir do qual descobriram a insulina e realizaram os primeiros estudos em busca de uma terapêutica apropriada para tratar o DM (PICKUP & WILLIANS, 1997).

Como o DM é transmitido geneticamente e demora muito tempo para determinar alterações fisiopatológicas, os modelos experimentais podem ser utilizados para aumentar a rapidez no desenvolvimento da doença. Atualmente é aceito que o DM insulino dependente (DMID) se caracteriza pela destruição auto-imune das células beta pancreáticas, que são as responsáveis pela produção da insulina. A utilização de animais com DM auto-imune e, mais recentemente, o aparecimento de modelos experimentais transgênicos, que possuem a expressão imune para o desenvolvimento

da doença, tem ajudado a esclarecer as condições moleculares que podem ocorrer em humanos (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Um dos principais desafios na geração do DM experimental em roedores foi resolvido com a utilização da estreptozotocina, droga que atua diretamente na indução da morte das células beta pancreáticas. Entretanto, para o estudo da neuropatia diabética, os animais devem sobreviver por um longo período de tempo, e a mortalidade aumentada neste período dificulta a utilização do modelo (HOUNSOM & TOMLISON, 1997).

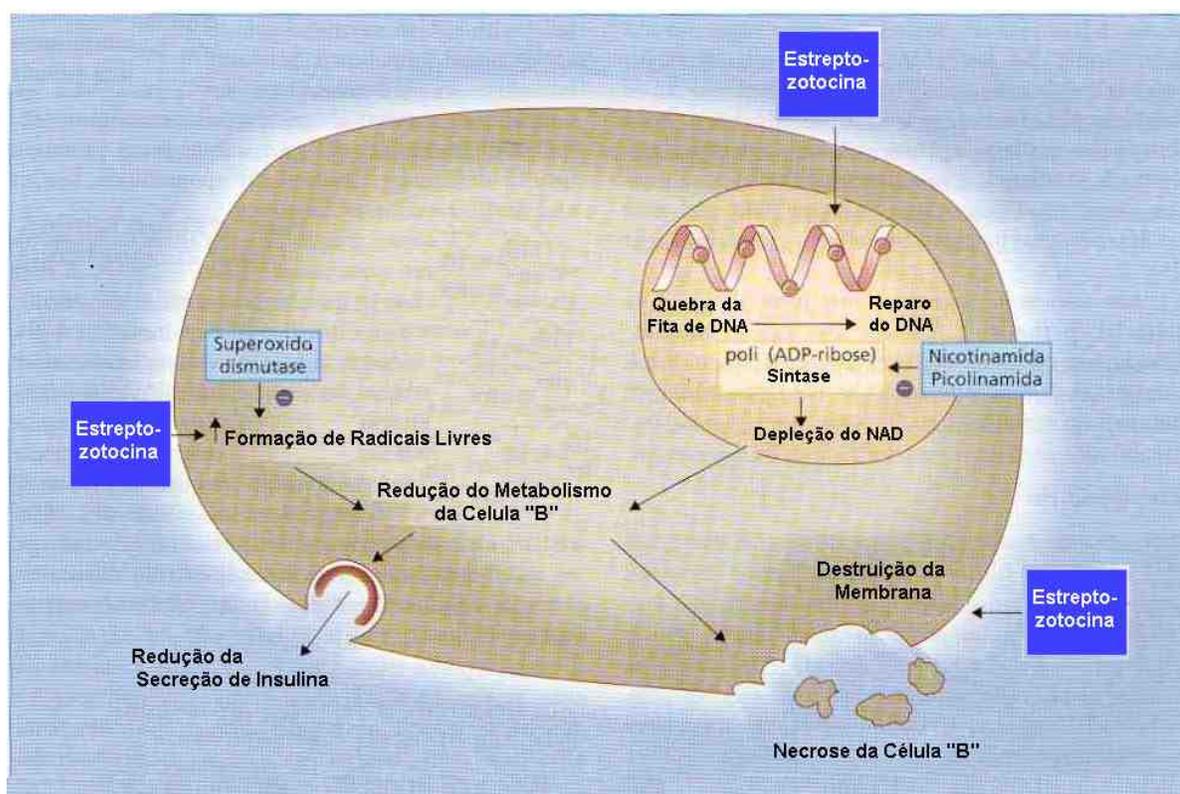
A estreptozotocina (STZ), que atualmente é chamada de estreptozocina nos Estados Unidos, é uma nitrosurea isolada, derivada do *Streptomyces griseus*, que, ao ser administrada em animais saudáveis, causa grave deficiência na liberação da insulina pancreática. Pode ser aplicada numa dose única, variando de 50 a 100 mg/Kg de peso corporal ou pode ser administrada em múltiplas pequenas doses. Quando administrada em altas doses, pode induzir profunda deficiência de insulina e contribuir para o quadro de cetose espontânea e, em alguns casos, com a morte do animal. A partir da administração e da necrose das células beta, o DM se desenvolve em um ou dois dias.

O mecanismo de ação da estreptozotocina é semelhante ao de outra droga também utilizada para desenvolver o DM, o aloxano. Após a administração do aloxano ou da STZ, ocorre destruição das membranas celulares e indução na quebra do DNA, levando à ativação da enzima poli (ADP-ribose) sintase e à depleção da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (YAMAMOTO, et. al., 1981). Esta enzima está localizada no núcleo das células beta do pâncreas e necessita de NAD para realizar o reparo do DNA nuclear. Um aumento na sua atividade pode levar à depleção do NAD intracelular, sendo impossível produzir insulina nas células beta do pâncreas. Os fenômenos citados anteriormente podem ser prevenidos através da administração de nicotinamida e picolinamida, pois são substâncias que inibem a ação da poli (ADP-ribose) sintase, ocorrendo assim uma homeostase nos níveis de NAD intracelular e na produção da insulina (UCHIGATA, et. al., 1983).

A formação de radicais livres parece ter implicação na destruição das células beta, pois enzimas que conseguem neutralizar a formação destes radicais, como a enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), ao serem administradas em animais

que receberam a estreptozotocina diminuíam os efeitos diabetogênicos determinados pela administração da droga (ROBBINS, et.al., 1980). **Figura 2.**

Like e Rossini (1976) desenvolveram o DM em camundongos após a aplicação de repetidas doses subdiabetogênicas de STZ (5 mg/Kg de peso corporal). As alterações decorrentes foram semelhantes às observadas em humanos, com grande quantidade de células inflamatórias nas ilhotas pancreáticas, sugerindo uma resposta auto-imune, que influenciaria alguns fatores genéticos dos próprios animais. A partir dessas constatações, iniciaram-se os estudos com as linhagem de animais geneticamente modificados para desenvolver o DM (LIKE e ROSSINI, 1976).

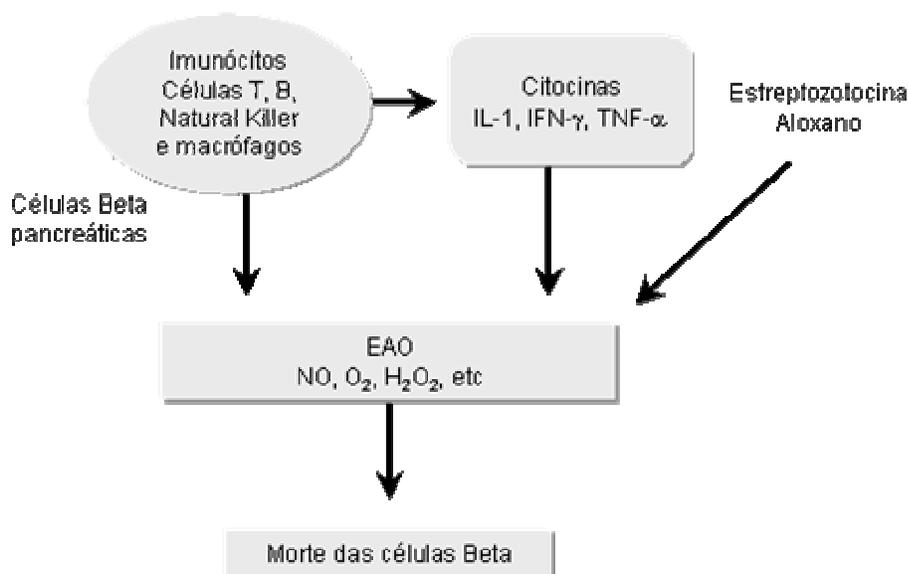


**FIGURA 2.** Atuação da estreptozotocina nas células pancreáticas beta (produtoras de insulina). (Adaptado de PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Como o DM é considerado uma doença auto-imune, estudos recentes sugerem que as Espécies Ativas de Oxigênio (EAO) podem participar na sua patogênese (HOTTA et. al., 2000). A tioredoxina (TRX) é uma proteína com peso de 12 quilodaltons (kDa) que participa na manutenção da homeostase celular e possui um efeito protetor

contra o estresse oxidativo, pois é uma "varredora" das EAO. Atua também na reparação do DNA celular e bloqueia a apoptose (morte celular programada). Como as EAO podem estar envolvidas na destruição das células beta, a TRX parece ter um papel fundamental na proteção das células pancreáticas (BAKER, et. al., 1997)

Recentes estudos têm mostrado que o ânion radical superóxido ( $O^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) são formados pelos macrófagos nas células  $\beta$ -pancreáticas, a partir de citocinas liberadas pelas células de defesa. Nota-se também que a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) está aumentada no fígado de animais que receberam a STZ. Estas alterações ocorrem em resposta à administração de uma droga que induz o DM (HOTTA, et. al., 2000). **Figura 3.**



**FIGURA 3.** Mecanismo da destruição das células pancreáticas na indução do DM através da administração de STZ e aloxano. (Adaptado de HOTTA et. al., 2000). (IL-1- interleucina 1; IFN- $\gamma$ - interferon gama; TNF- $\alpha$ - fator de necrose tumoral alfa).

### 1.3 FORMAÇÃO DAS ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

O oxigênio existente na atmosfera é um dos responsáveis pelo fornecimento de energia celular para as células de nosso organismo, pois mantém as funções

bioquímicas intra e intercelulares, entretanto através deste metabolismo aeróbico há maior chance de formar as EAO e conseqüentemente o estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A formação das espécies ativas de oxigênio e nitrogênio (EAON) nos sistemas biológicos está bem estabelecida, pois é observada a geração destas espécies em diversos locais, na mitocôndria, lisossomas, peroxissomas, membrana plasmática e nuclear, retículo endoplasmático, bem como no citosol.

A geração das EAON ocasiona o estresse oxidativo e nitrosativo, que no sistema biológico está associado ao aumento da velocidade na geração de espécies oxidantes e/ou à diminuição da atividade dos sistemas de defesa. Os radicais livres produzidos podem ser formados pela perda ou ganho de um elétron de um não-radical, ou pela quebra de uma ligação covalente, ou seja, se cada um dos átomos ficar com um elétron desemparelhado. Esse processo é denominado de fissão homolítica (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

O  $O_2^{\bullet-}$  pode ser produzido por células inflamatórias como os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos. A partir do  $O_2^{\bullet-}$  são formadas outras EAO, que são utilizadas pelas células fagocitárias para destruir os microorganismos invasores (MENEHINI, 1987; SOUTHORN & POWIS, 1988).

Pacientes com granulomatose crônica possuem células fagocitárias incapazes de produzir as EAO, embora sejam aptas para realizar a fagocitose. O fato desses pacientes apresentarem processo inflamatório grave sugere que a produção de EAO é importante no combate a agentes invasores (BABIOR, 1982).

Muitos sistemas enzimáticos catalisam a redução univalente do oxigênio molecular à radical superóxido, como a xantina oxidase, a aldeído oxidase, a di-hidro-orótico desidrogenase, a flavina desidrogenase e as peroxidases (FRIDOVICH, 1976).

Outras enzimas, como aquelas que catalisam a formação das prostaglandinas (ciclooxigenase) e leucotrienos (lipoxigenase), também são fontes de  $O_2^{\bullet-}$  (MACHLIN & BENDICH, 1987). A redução univalente do oxigênio ocorre nas catecolaminas, nas flavinas e nas ferridoxinas reduzidas (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

A auto-oxidação das catecolaminas produz EAO e estas podem causar danos ao tecido cardíaco, como a necrose ocorrida no infarto do miocárdio, observada após a administração de altas doses de catecolaminas (BELLÓ KLEIN, 1993). Uma fonte substancial de  $O_2^{\bullet-}$  é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

O  $H_2O_2$  pode ser produzido por duas fontes básicas: indiretamente, pela redução univalente do oxigênio, seguida pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$  ou, diretamente, pela redução divalente do oxigênio molecular. O processo indireto é catalisado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) cobre-zinco (CuZn-SOD) e encontra-se no citosol celular, e pela isoforma dependente de manganês (Mn-SOD) que se situa na mitocôndria. O processo direto é realizado pelas oxidases como a D-aminoácido oxidase, a xantina oxidase, a uricase, a alfa-hidroxiácido oxidase e a glicolato oxidase (DEL MAESTRO, 1980; SOUTHORN & POWIS, 1988).

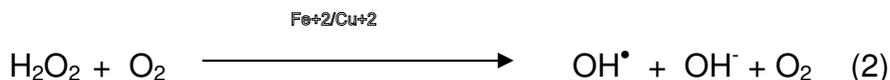
A geração mitocondrial de  $H_2O_2$  é um evento fisiológico sob condições aeróbias e depende do estado metabólico em que a célula se encontra. O aumento da pressão parcial de oxigênio produz uma elevação proporcional na formação de  $H_2O_2$  na mitocôndria (BOVERIS & CHANCE, 1973).

Os peroxissomas contêm muitas enzimas geradoras de  $H_2O_2$ , as quais estão envolvidas em importantes funções fisiológicas, como na oxidação dos ácidos graxos, na produção de hormônios esteróides e lipídios em glândulas sebáceas, na fagocitose, na termogênese e na esterificação da vitamina A pelas células da retina (CHANCE, et. al., 1979).

As reações que produzem o  $OH^{\bullet}$  são mais raras e necessitam da presença de metais de transição como o ferro e o cobre. A reação de  $H_2O_2$  com os íons ferroso ou cuproso é chamada reação de Fenton, descoberta no ano de 1894, a qual gera um  $OH^{\bullet}$  extremamente reativo (**Reação 1**).



O  $\text{OH}^\bullet$  também pode ser formado a partir da reação do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de íons ferro ou cobre. Essa reação foi descrita por Haber e Weiss no ano de 1934 (**Reação 2**).



O ferro necessário para catalisar a reação de Fenton pode ser proveniente da ferritina, da hemoglobina ou da mioglobina (WERNIS & LUCCHESI, 1990). Os radicais livres, derivados da interação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  com a metamioglobina, podem desencadear o processo de lipoperoxidação, que pode danificar a célula (KANNER & HAREL, 1985).

Quando o metabolismo do nitrogênio está envolvido na formação das EAN, o óxido nítrico (NO) participa diretamente nas reações que culminam com a desregulação de sua síntese (GATÉ et. al., 1999). O NO é sintetizado a partir da L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que transforma a L-arginina em L-hidroxiarginina, formando, assim, a citrulina e o NO.

Mesmo sendo uma molécula simples, sua síntese enzimática é bastante complexa. As NOS pertencem à família enzimática que sintetiza o NO e são enzimas que utilizam como substratos a forma reduzida do fosfato nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) e moléculas de oxigênio. São subdivididas, em função de sua atividade, em constitutivas (cNOS) e induzidas (iNOS) (YUNES & CALIXTRO, 2001).

Atualmente, acredita-se que a forma constitutiva pode ser sintetizada em diversas situações. Independente dessa subdivisão, as NOS são descritas como 3 isoformas, baseadas em 3 genes diferentes, já seqüenciados. São elas: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS); óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (ambas constitutivas) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS). (GROSS e WOLIN, 1995; SZABO et al., 2000).

Quanto à ação de cada uma das NOS, sabe-se que a eNOS, encontrada no endotélio vascular, gera baixas concentrações de NO, favorece a diminuição da pressão sangüínea e auxilia na inibição da agregação plaquetária. Já a isoforma nNOS gera o NO, regula a transmissão neuronal e apresenta a função de neurotransmissor. A iNOS produz o NO estimulada por certas citotoxinas, pelos hepatócitos independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e dependente de calmodulina, e pelos macrófagos. Este NO está intimamente

ligado aos processos de defesa do organismo e, em função da produção excessiva, relaciona-se aos processos destrutivos teciduais presentes na inflamação aguda ou crônica e na apoptose celular (SZABO, et al., 2000; PASA e PEDROSA, 2001).

Apesar de apresentar diversas funções, acredita-se que os efeitos fisiológicos e fisiopatológicos do NO estejam vinculados a sua concentração, podendo, assim, interagir com metais de transição e formar outros radicais livres. Em concentrações elevadas forma o trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), passando a formar mais EAN (HUIE E PADMAJA, 1993).

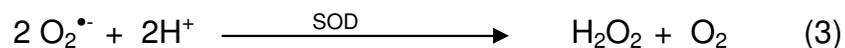
## 1.4- DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os sistemas antioxidantes de defesa do organismo são formados pelo sistema enzimático e não enzimático.

### 1.4.1- Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são enzimas que removem as EAON e outras espécies reativas, destacamos as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (MARKS, et. al., 1996).

A SOD é uma enzima que catalisa a dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> (**Reação 3**). Essa reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico, porém, sua velocidade é 10<sup>4</sup> vezes maior com a presença da SOD (SHOUTORN & POWIS, 1988).



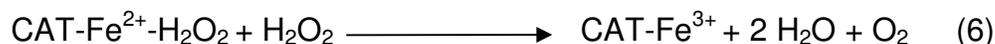
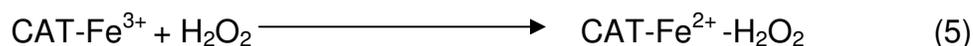
Essa enzima é ubíqua e apresenta uma variedade de isoformas. Uma delas contém cobre e zinco (CuZn-SOD) em seu sítio de ativação e é encontrada no citosol das células eucarióticas. Sua atividade enzimática foi descoberta por McCord e Fridovich (1969). Dentro da mitocôndria, a SOD está presente, ligada ao manganês (Mn-SOD), estando localizada na matriz mitocondrial. Mais recentemente Bates e colaboradores (1995) descreveram uma isoforma da NOS presente exclusivamente na mitocôndria, que é a SOD mitocondrial (mtSOD) (BATES, et. al., 1995). A estimulação

determinada pelo aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$  e pela ação da mtSOD pode resultar na formação de elevadas concentrações de  $ONOO^-$  e aumentar o efeito deletério local (mitocôndria), ou contribuir para maior dano celular. (BRINGOLD, et. al., 2000). Além disso, uma ferro-enzima (Fe-SOD) foi identificada em bactérias e plantas (CHANCE et. al., 1979).

O  $H_2O_2$ , formado pela dismutação do  $O_2^{\bullet-}$ , pode ser transformado em  $H_2O$  pela reação da CAT, (**Reação 4**).



A CAT que está presente em todos os tecidos de mamíferos é uma hemoproteína com atividade de peroxidase específica para  $H_2O_2$ . Esse atua simultaneamente como hidróperóxido e como doador de hidrogênio (**Reações 5 e 6**).

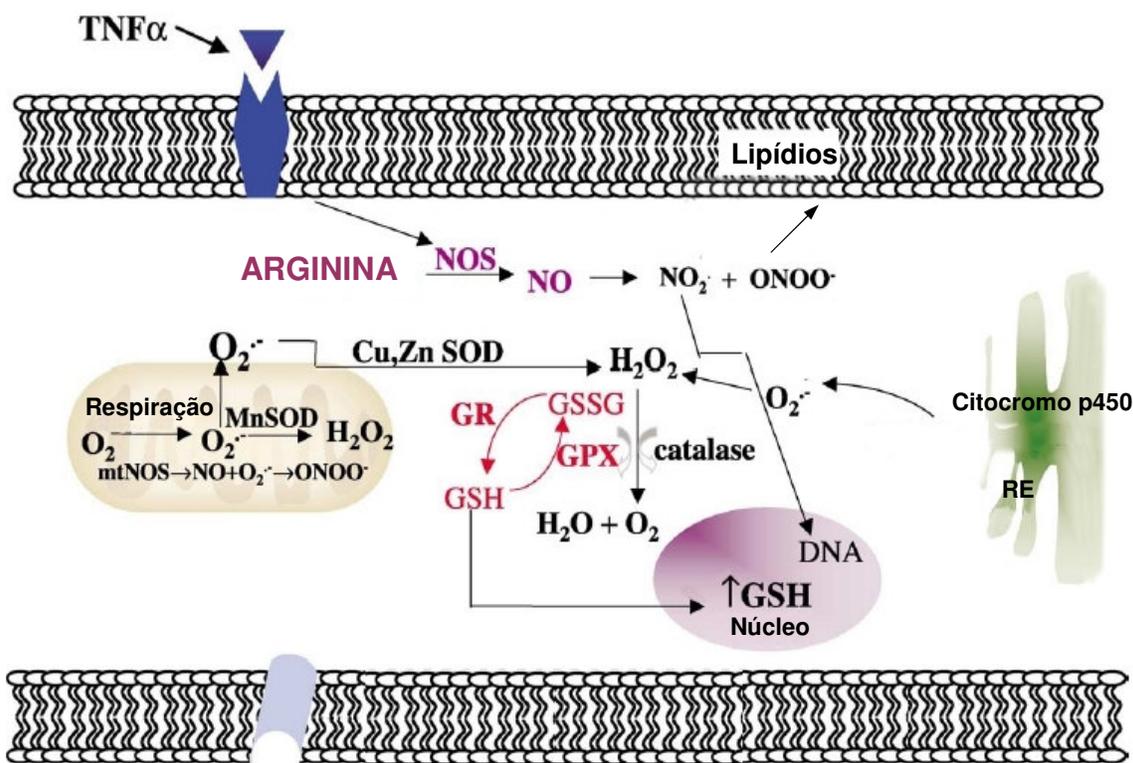


O mecanismo catalítico da CAT e a sua velocidade de reação muito alta dificultam a sua saturação pelo seu substrato, o  $H_2O_2$ . A CAT se encontra, principalmente nos peroxissomas, de onde remove o  $H_2O_2$  gerado pela  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos ou pela oxidação dos alcanos. Também está presente nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma. A sua alta atividade catalítica é a responsável pela regulação dos níveis intracelulares de  $H_2O_2$ .

A GPx pode reagir com grande variedade de peróxidos e hidróperóxidos, além do  $H_2O_2$  e dos hidróperóxidos derivados dos ácidos graxos, e necessita da glutathiona reduzida (GSH) como co-substrato (**Reação 7**). A razão celular entre a glutathiona reduzida e a oxidada (GSH/GSSG) é elevada, pois existe um mecanismo que reduz a GSSG novamente a GSH, realizado pela enzima glutathiona redutase (GRd). (**Reação 8**)



Um resumo das reações que ocorrem na redução do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser melhor visualizado na **Figura 4**.



**FIGURA 4.** Decomposição do ânion superóxido gerado na mitocôndria e no citosol e atuação enzimática. (Adaptado de CURTIN et. al., 2002).  $\text{TNF-}\alpha$ =fator de necrose tumoral alfa; mtNOS=óxido nítrico sintase mitocondrial; RE=retículo endoplasmático.

#### 1.4.2- Antioxidantes não-enzimáticos

O sistema de defesa não-enzimático é formado por antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis. Os antioxidantes hidrossolúveis são compostos que têm alta afinidade pela água, como a glutathiona (GSH), o ácido úrico e o ácido ascórbico (vitamina C). Os antioxidantes lipossolúveis são compostos que têm alta afinidade por lipídios,

destacam-se os carotenóides, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e a bilirrubina. (MURPHY & SIES, 1991). Os polifenóis, antioxidantes lipossolúveis, são compostos por um ou mais anéis aromáticos que possuem grupos hidroxilas, sendo, portanto, capazes de quelar metais e varrer radicais livres pela formação de radicais fenoxil. Um outro grupo de polifenóis com atividade antioxidante importante são os flavonóides, que podem ser subdivididos em seis subclasses: flavononas, flavonas, flavonóis, flavanóis, catequinas e isoflavonas (ROSS e KASUM, 2002).

A atividade antioxidante dos flavonóides refere-se ao fato de serem quelantes de metais, varredores de radicais livres, inclusive o  $\text{OH}^\bullet$ , e neutralizarem o oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ). Atualmente, estuda-se a respeito da estrutura dos flavonóides e a ação antioxidante. A quercetina (flavonóide) é um antioxidante muito efetivo, pois possui uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, substituintes hidroxilas nos carbonos 3, 5 e 7 e o grupo catecol no anel B. A rutina também é um eficiente antioxidante, diferindo da quercetina pela substituição de carbono 3, onde apresenta um rutinosídeo (TRUEBA e SÁNCHEZ, 2001).

## 1.5- ANTIOXIDANTES E DIABETES MELLITUS

O modelo experimental de DM é utilizado para avaliar os efeitos antioxidantes de diversas substâncias. Coppey e colaboradores (2001) verificaram o fluxo endoneural e o relaxamento vascular dependente do endotélio, bem como a atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dependente no nervo ciático de animais diabéticos, após um suplemento de 0,5% de ácido  $\alpha$ -lipólico na dieta. Os animais diabéticos apresentaram menor relaxamento vascular dependente do endotélio, bem como diminuição na atividade da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, que reverteram após a administração da dieta. Através deste estudo, os autores propuseram o uso de antioxidantes na neuropatia diabética (COPPEY, et. al., 2001).

A combinação entre a vitamina E e C diminui o estresse oxidativo e contribui para um número menor de malformações fetais na prole de ratas diabéticas, pois sabe-se que 5 a 10% das progenitoras diabéticas irão apresentar alterações durante a gravidez (CEDERBERG, et. al., 2001).

O uso de vitamina E contribui para uma proteção na peroxidação lipídica e diminui os níveis de glicose plasmática em animais com DM induzidos por STZ, já que sua deficiência aumenta os níveis de peroxidação lipídica, avaliados pelas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (VANNUCHI, et. al., 1999).

Outra forma de induzir DM experimental é administrar aloxano aos animais. Essa droga, quando presente na circulação sistêmica, destrói as células beta do pâncreas e contribui para o aumento da glicose sangüínea. Em animais diabéticos induzidos pela administração de aloxano, foi verificado que a peroxidação lipídica está aumentada, e os níveis das enzimas antioxidantes GPx e SOD diminui. Após a administração oral da melatonina, na dose de 200 µg diariamente, houve diminuição na peroxidação lipídica e aumento na atividade das enzimas antioxidantes, bem como regulação da glicose sangüínea nos animais diabéticos (SAILAJA DEVI, et. al., 2000.)

O estudo realizado por Vural e colaboradores (2001) mostrou que a administração de melatonina intraperitonealmente, na dose de 10mg/Kg de peso corporal pelo período de seis semanas, em animais diabéticos, restaura os níveis das enzimas antioxidantes GPx e SOD, bem como o TBARS (VURAL, et. al., 2001).

A boldina, maior alcalóide encontrada na casca do boldo (*Peumus boldus* Molina), quando administrada na dose de 100mg/Kg de peso corporal diariamente, na água de beber pelo período de 8 semanas, diminui o TBARS, as carbonilas, bem como contribui para o retorno das enzimas antioxidantes GPx e SOD aos níveis basais. As enzimas avaliadas estavam aumentadas nas mitocôndrias do tecido pancreático, renal e hepático de animais diabéticos.(JANG, et. al., 2000).

Hünkar e colaboradores (2002) avaliaram o efeito da administração oral de óleo de fígado de bacalhau na dose de 0,5 mL/Kg de peso corporal pelo período de 12 semanas e observaram diminuição da glicose sangüínea e da peroxidação lipídica na aorta, no coração e no fígado dos animais com DM (HÜNKAR, et. al., 2002).

Uma dieta rica em flavonóis foi administrada em 10 pacientes com DM tipo II, e foi avaliada a destruição do DNA de linfócitos em decorrência do estresse oxidativo. Os pacientes receberam por duas semanas uma dieta com baixas concentrações de flavonóis e posteriormente, pelo mesmo período de tempo, uma dieta rica em flavonóis (76 a 100 mg). A maior concentração do antioxidante era de quercetina. A

concentração de flavonóis no plasma após a dieta rica foi 12 vezes maior que a dieta em dose baixa. O dano oxidativo ao DNA dos linfócitos foi estatisticamente menor após dieta rica em flavonóis (LEAN, et. al., 1999). Os flavonóis e as flavonas são compostos naturais usualmente encontrados nos alimentos, bem como o O-glicosídeo com D-glicose, pois são resíduos de açúcares.

## 1.6- FLAVONÓIDES

Os flavonóides são um grupo de componentes polifenólicos encontrados em grande quantidade nas frutas e nos vegetais, cuja ingestão humana diária, em países ocidentais, fica em torno de 23mg/dia (HERTOG, et. al., 1993). O interesse em estudar estes componentes é que apresentam efeito farmacológico sobre determinadas doenças. Nesta situação haveria maior “varredura” dos radicais livres pelas estruturas presentes nos compostos administrados e/ou ingeridos e uma maior efetividade das enzimas antioxidantes (VAN ACHER, et. al., 1996).

Na família dos flavonóides estão os flavonólis, as flavonas, as isoflavonas e o 2,3-di-hidroderivado das flavonas, chamado de flavononas. As flavononas podem sofrer transformações que afetam o anel heterocíclico C, formando outra família de flavonóides, que incluem as antocianinas e as catequinas. A estrutura dos flavonóides confere propriedade antioxidante e capacidade de atuar frente aos radicais livres, porque possuem múltiplas estruturas OH (hidroxilas) ligadas aos grupos aromáticos (CAO, et. al., 1997).

Outro efeito apresentado pelos flavonóides é o de participar da sinalização molecular intracelular, além da atividade antioxidante já conhecida. Este efeito poderia modular as ações celulares, bem como a ação de vias sinalizadoras das proteínas, das tirosinas e das lipídios-quinases. Ações nas vias enzimáticas intracelulares, e efeito benéfico no tratamento de doenças crônicas, como as que afetam o sistema nervoso em relação à plasticidade celular nervosa podem ocorrer (WILLIAMS, et. al., 2004).

Pela ação dos radicais livres sobre a membrana plasmática, Saija e colaboradores (1995) questionaram qual seria o antioxidante que teria um efeito

protetor sobre a membrana plasmática celular. A quercetina parece ser eficaz, atuando sobre os radicais livres, principalmente contra o  $\text{OH}^\bullet$  e o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (SAIJA, et.al.,1995).

A quercetina, principal composto flavonol, é encontrada na alimentação e lhe é atribuída uma excelente resposta antioxidante contra o estresse oxidativo (RICE-EVANS e MILLER, 1996).

## 1.7 QUERCETINA

A quercetina faz parte do grupo dos flavonóis e há um crescente interesse em estudar este antioxidante. Estudos *in vitro* mostraram o seu benefício na inibição da agregação plaquetária (TZENG, et. al., 1991), na detoxicação de diversas enzimas (UDA, et. al., 1997), bem como efeito na inibição do crescimento de certas células tumorais humanas do cólon (RANELLETTI, et. al., 1992) e do trato gastrointestinal (YOSHIDA, et. al., 1990). A atividade biológica dos flavonóis é altamente dependente da sua estrutura, particularmente porque possui vários grupos hidroxil (OH). Avaliando uma estrutura presente nos flavonóis (aglicona) *in vitro* percebe-se que, na forma glicosilada, não apresenta grande capacidade antioxidante (PLUMB, et. al., 1999).

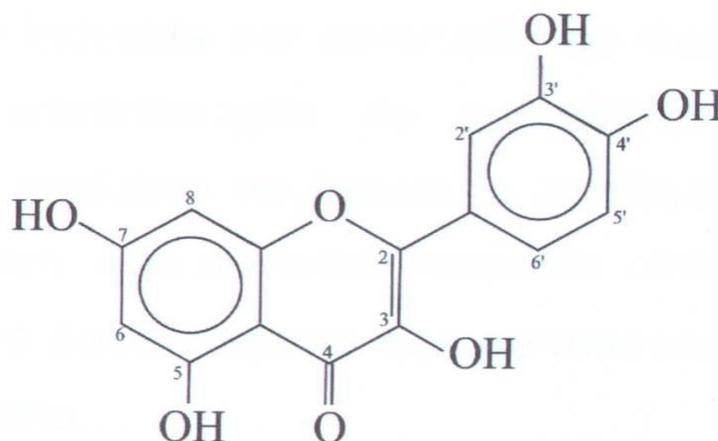
Day e colaboradores (2000) estudaram a conjugação de glicuronídeos à estrutura da quercetina ingerida e o potencial efeito antioxidante. Houve inibição da lipoxigenase (potente via inflamatória) mesmo quando há alteração na forma estrutural da quercetina. Dependendo da conjugação dos glicuronídeos com a quercetina, há uma variação na concentração plasmática e no efeito antioxidante (DAY, et. al., 2000).

O mesmo grupo avaliou o efeito da quercetina através da ingestão do consumo de cebola (rica fonte de quercetina) e concluiu que, uma hora e meia após a sua ingestão, a quercetina glicosilada não está mais na circulação, e sim em três formas similares à estrutura original. Isto sugere que os metabólitos plasmáticos da quercetina quando conjugados podem apresentar diferentes atividades biológicas (DAY, et. al., 2001).

O efeito da quercetina foi comparado ao de outro antioxidante encontrado em diversos nutrientes, a catequina, cujos metabólitos foram analisados no plasma e no fígado através da técnica de HPLC. Os metabólitos da quercetina foram mantidos durante o período pós-absortivo, mas os derivados da catequina diminuíram

drasticamente entre 12 e 24 horas após a ingestão. Estes achados sugerem maior efeito antioxidante da quercetina quando comparado ao da catequina (MANACH, 1999).

A quercetina ingerida na dieta não é totalmente absorvida no tubo digestivo, e os metabólitos formados contribuem para alterar o efeito antioxidante da quercetina. Knekt e colaboradores (2000), avaliaram o efeito da quercetina e a incidência de doença cerebrovascular. Esse estudo foi realizado com grande número de pacientes, 9.208 indivíduos, entre os anos de 1966 e 1972. Os resultados sugerem que a ingestão de maçã está relacionada à diminuição no risco de doença cerebrovascular de origem trombótica. Entretanto não foi encontrada uma associação quando a quercetina foi analisada isoladamente (KNEKT, et. al., 2000).



**Figura 5.** Estrutura química da quercetina. Os grupos OH estão presentes nos anéis A, B e C (posições 7,5,3,3',4' e Grupo ceto na posição 4

Estudos experimentais realizados em animais com DM sugerem que a quercetina possui efeito antioxidante, e interfere na evolução da doença. A nefropatia diabética é uma importante complicação vascular apresentada por pacientes com DM, sendo a principal responsável pelo desenvolvimento da doença renal crônica.

Anjaneyulu e Chopra (2004) administraram a quercetina na dose de 10mg/Kg de peso corporal diariamente, por 4 semanas, em animais com DM induzidos por STZ. Houve melhora na depuração da uréia e da creatinina e diminuição do estresse

oxidativo nos animais diabéticos, além de aumentar os níveis de GSH e a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT. A quercetina também diminuiu a formação do malondealdeído do tecido renal (ANJANEYULU e CHOPRA, 2004).

Existe um efeito da quercetina sobre os níveis séricos de colesterol total, LDL colesterol (lipoproteína de baixa densidade), triglicerídeos e HDL colesterol (lipoproteína de alta densidade). É bem sabido que as doenças vasculares estão diretamente relacionada à oxidação do LDL e a diminuição do HDL. No estudo de Fernandes e colaboradores (2004) os animais diabéticos que receberam a quercetina na dose de 50mg/Kg de peso corporal por 30 dias elevaram a taxa do HDL, e diminuíram os níveis de LDL, de colesterol total e de triglicerídeos. Esses resultados sugerem que a quercetina interfere no metabolismo lipídico e diminui o risco para o aparecimento de doenças vasculares (FERNANDES, et. al., 2004).

Em estudo recente foi administrado quercetina em animais diabéticos em duas doses distintas (50mg/Kg e 80mg/Kg) por 45 dias, e avaliado a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, bem como o TBARS plasmático. Foi observado um melhor efeito na dose de 50mg/Kg. Isto sugere que o estresse oxidativo pode ser revertido com a administração da quercetina em animais com DM (MAHESH e MENON, 2004).

## **1.8- DIABETES MELLITUS, ESTRESSE OXIDATIVO, ÓXIDO NÍTRICO E FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR**

O estresse oxidativo é um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das complicações causadas pelo DM, no qual diversos tecidos podem estar afetados a partir da instalação da doença. Dentre as complicações do DM estão a neuropatia, a nefropatia e a retinopatia diabética. O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre as espécies ativas de oxigênio (EAO),  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$ ,  $ONOO^-$  e o  $H_2O_2$ , e os componentes antioxidantes enzimáticos (SOD, CAT e GPx) e não-enzimáticos (GSH, vitamina C e E) (HALLIWEL E GUTTERIDGE, 1999).

A geração das EAO está envolvida em diversas situações fisiológicas e o envolvimento mais conhecido é a resposta inflamatória. A formação dos radicais livres ocorre quando as moléculas estão com o seu orbital eletrônico desemparelhado e

necessitam de outras estruturas para se estabilizar. O radical mais abundante dentro do sistema biológico é o oxigênio molecular ( $O_2$ ), e, a partir dele os radicais livres são gerados. Daí o nome de espécies ativas de oxigênio. O  $O_2^{\bullet-}$  e o  $OH^{\bullet}$  são particularmente as espécies que mais reagem nos processos de lesão tecidual. O  $H_2O_2$  não é um radical livre, mas contribui para aumentar a toxicidade celular quando reage com outras moléculas (DNA celular, membrana celular e proteínas) (REILLY, et. al., 1991).

O mecanismo pelo qual as espécies ativas de oxigênio participam da resposta inflamatória é iniciado pelo aumento na produção de diversos marcadores inflamatórios oriundos das células de defesa. As EAO são formadas na mitocôndria celular durante o metabolismo aeróbico, como também no metabolismo da xantina oxidase. A partir de sua formação, estimulam a ativação dos fatores de transcrição celular, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e as MAPs quinases (MAPKs). Com o aumento na produção das citocinas inflamatórias (fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e das diversas interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) ocorre a resposta inflamatória sistêmica (CLOSA e FOLCH-PUY, 2004).

As EAO estariam envolvidas e seriam as principais responsáveis pelas alterações fisiopatológicas do DM (CERIELO, et. al., 2001). Moléculas com elétrons desemparelhados, gerados a partir do DM, podem reagir com o NO, que é um dos maiores sinalizadores biológicos em nosso organismo, e formar as espécies ativas de nitrogênio (EAN), como o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (SQUADRITO e PRYOR, 1995).

O  $ONOO^-$  pode reagir com os aminoácidos tirosina e cisteína e produzir a nitrotirosina e a nitrocisteína, considerados os promotores das reações entre as EAO e o NO. A mitocôndria é o local em que o NO é formado em maior quantidade, e o tempo de formação fica em torno de 10 milissegundos. Quando formado em excesso pode difundir-se através da membrana intracelular e inibir diversas reações biológicas, como a inibição da atividade da SOD (RADI, et. al., 2002).

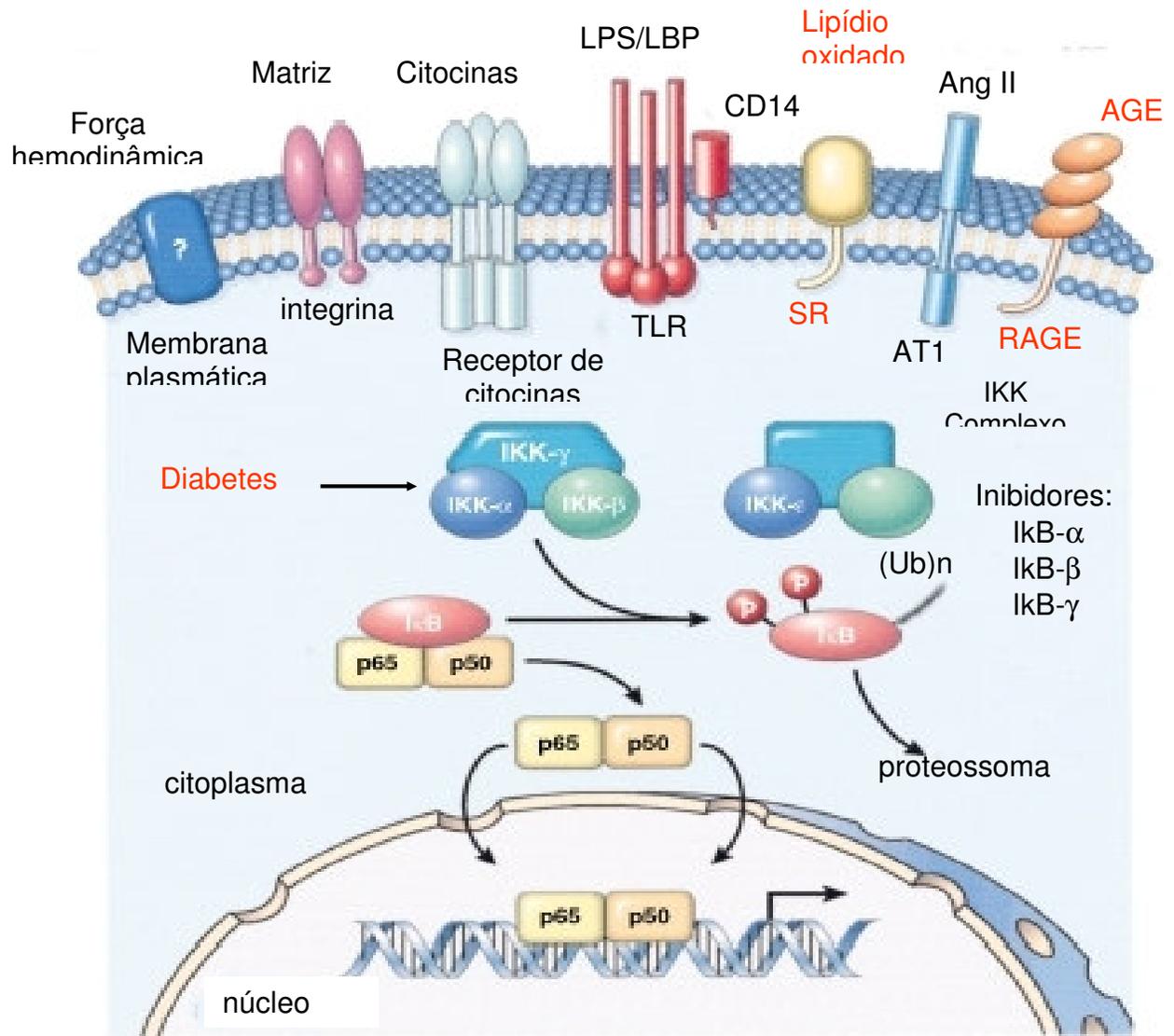
As reações com o  $ONOO^-$  ocorrem nas células hepáticas e contribuem para a alteração tecidual local. Bringold e colaboradores (2000) demonstraram que o aumento na formação do  $ONOO^-$  mitocondrial hepático contribuiu para a oxidação dos nucleotídeos peridíneos e ao administrar um dos inibidores da síntese do NO, L-NG-

monometil-arginina- (L-NMMA) as alterações hepáticas diminuíram (BRINGOLD, et. al., 2000).

A hiperglicemia estimula a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é acompanhada pelo aumento na geração de NO (SPITALER e GRAIER, 2002). O NO reage com o  $O_2^{\bullet-}$  e forma o potente oxidante, peroxinitrito, aumentando a peroxidação dos lipídios, alterando o metabolismo das proteínas, a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e afetando as vias sinalizadoras de transdução celular. (GRIENDLING e FITZGERALD, 2003) Evidências experimentais suportam que o NO, as EAO e o peroxinitrito interferem no desenvolvimento do DM agudo antes de existirem as complicações da doença (STADLER, et. al., 2004).

O aumento na formação do NO pode ser detectado em fluídos biológicos através da realização do método de Griess, pois são mensurados os produtos finais das reações metabólicas, os nitritos ( $NO_2^-$ ) e os nitratos ( $NO_3^-$ ). Maejima e colaboradores (2001) encontraram uma elevação nos níveis de  $NO_2^-$  e  $NO_3^-$  plasmáticos em pacientes com DM tipo II, juntamente com maior incidência de complicações microvasculares. (MAEJIMA, et. al., 2001).

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) está envolvido no processo fisiopatológico do DM (HATTORI, et. al., 2000). O NF- $\kappa$ B é composto por membros da família Rel, que possui uma região ácida composta por 300 aminoácidos, conhecido como domínio homólogo Rel, com função de mediar a interação com os inibidores do NF- $\kappa$ B. Especificamente, é composto por um complexo heterodímico denominado p50 e p65 (KARIN, 1999). A ativação do NF- $\kappa$ B é controlada pela família de inibidores (denominados I $\kappa$ Bs), que estão ligadas no dímero do NF- $\kappa$ B, e inibem sua função e mantém o complexo inativo no citoplasma celular. Diversos estímulos ativam o NF- $\kappa$ B, como a fosforilação e a ativação do complexo I $\kappa$ B quinase (IKK). Esse complexo consiste de duas subunidades (dois heterodímeros denominados IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ) que fazem parte da subunidade IKK- $\gamma$  e provavelmente de outros componentes que ainda não possuem uma função bem descrita na literatura. (**Figura 6**).



**Figura 6-** Representação esquemática da ativação do NF-κB e sua integração com os fatores envolvidos no diabetes mellitus. (Ang II=angiotensina II, AT1=receptor de angiotensina I, AGE=*Advanced glycosilation end products*- produtos da glicosilação avançada final, RAGE= receptor das AGEs, LPS= lipopolisacarídeos/LPB= proteína de ligação do LPS, TLR=*tool like receptor*- complexo como receptor. (Adaptado de COLLINS e CYBULSKY, 2001).

A ativação do complexo IKK fosforila especificamente os I $\kappa$ Bs, através da degradação de seus proteossomas. Após a liberação da inibição do NF- $\kappa$ B, há translocação do mesmo do citoplasma celular em direção ao núcleo, estimulando a transcrição celular. A ativação do NF- $\kappa$ B pode ser iniciada por uma variedade de alterações fisiopatológicas, como aumento na quantidade de citocinas circulantes e aumento na expressão das moléculas de adesão celular (MACs). O NF- $\kappa$ B também ativa o gen do I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\gamma$  que tem a função de inibir o próprio NF- $\kappa$ B.

Um aumento na expressão do I $\kappa$ B- $\alpha$  e/ou I $\kappa$ B- $\beta$  provocará maior ativação da inibição do NF- $\kappa$ B, pois a expressão do inibidor depende da ativação do próprio NF- $\kappa$ B. A auto-regulação deste complexo sistema determina ativação e retorno ao estado fisiológico. A ativação do complexo NF- $\kappa$ B, na presença de alguma doença, contribui com maior expressão gênica das moléculas envolvidas no processo inflamatório, caso do DM (COLLINS e CYBULSKY, 2001).

Diversos estudos clínicos foram realizados utilizando pacientes com DM e avaliando a ativação do NF- $\kappa$ B. O trabalho realizado por Hofmann e colaboradores (1998) avaliou pacientes com DM tipo I que possuíam controle glicêmico insuficiente, e houve maior ativação do NF- $\kappa$ B em células mononucleares sangüíneas periféricas, bem como uma correlação positiva entre a ativação e o estresse oxidativo (HOFMANN, et. al., 1998).

Arnalich e colaboradores (2001) avaliaram pacientes com DM tipo II e encontraram maior ativação do NF- $\kappa$ B, sendo este o responsável pela diminuição nos níveis de glutathiona intracelular (ARNALICH, et. al., 2001). Estes estudos sugerem que independentemente da presença do DM, o NF- $\kappa$ B é ativado, e há relação entre a sua ativação e o estresse oxidativo. O tratamento com antioxidantes atenuaria as complicações do DM. A quercetina e outros flavonóides, como a rutina, a mirecitina, o kaempferol exercem atividades antioxidantes. Como a quercetina atua terapeuticamente no câncer, na infecção viral, nos processos inflamatórios, na aterosclerose e na cirrose biliar secundária (PERES, et. al., 2000), e sendo o DM uma doença multifatorial, a investigação de substâncias que bloqueiem ou diminuam os danos hepáticos determinados pela doença é de extrema validade e relevância.

## **2 - OBJETIVOS**

---

## 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da quercetina sobre o estresse oxidativo hepático no modelo experimental de diabetes mellitus tipo I induzido por estreptozotocina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar o peso corporal e a glicose sangüínea dos animais pertencentes aos diferentes grupos estudados, no momento da indução do DM e no dia do sacrifício.
- 2) Avaliar os marcadores do estresse oxidativo no tecido hepático através das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da quimiluminescência (QL).
- 3) Quantificar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) no fígado de animais controle, controle que receberam a quercetina, diabéticos e diabéticos que receberam a quercetina, bem como os níveis citoplasmáticos da glutathione reduzida (GSH), glutathione oxidada (GSSG), e a relação GSSG/GSH.
- 4) Determinar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) através da técnica de *Western blot* no fígado de animais controle, diabético e diabético que receberam quercetina.
- 5) Avaliar os níveis citoplasmáticos hepáticos do complexo IKK (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ), que é o responsável pela fosforilação dos inibidores (I $\kappa$ Bs), bem como os inibidores do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$ ).
- 6) Determinar a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática nos diferentes grupos estudados.
- 7) Analisar o efeito da quercetina sobre o tecido hepático através da determinação dos aspectos histológicos.

## **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

---

## **3 - MATERIAL E MÉTODOS**

---

### **3.1 ANIMAIS**

Neste estudo foram utilizados 32 ratos machos, da linhagem Wistar, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). O peso médio dos animais no início do estudo variou de 200 a 300 gramas (g). Os animais foram colocados em caixas plásticas individuais medindo 30x18x13 centímetros cada uma, com assoalho coberto por serragem e foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de  $22\pm 4^{\circ}\text{C}$  em ciclo de 12 horas claro/escuro (luz das 7 às 19 horas). As caixas foram limpas todos os dias de acordo com a rotina do biotério. Todos os animais receberam água *ad libitum* e a ração utilizada foi da marca Nutripal (Moinhos Purina, Porto Alegre, RS/Brasil), composta por: 15,4% de proteína, 2,9% de gordura, 60,5% de carboidratos, 3,9% de fibras, 5,3% de minerais e 12% de água.

Todos os procedimentos experimentais realizados estavam de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. (GOLDIM, 1997), bem como o preconizado no *Principles for Research Involving Animals* (NAS).

### **3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados quatro grupos de oito animais cada: controle (co), controle+quercetina (co+q), diabéticos (db) e diabéticos+quercetina (db+q), e o número total em cada grupo no final do estudo foi estabelecido pela sobrevivência dos animais.

#### **3.2.1 Formação dos grupos**

Os animais foram divididos em:

- 1) Grupo controle (co): receberam somente solução fisiológica (NaCl 0,9%).
- 2) Grupo controle+quercetina (co+q): receberam solução fisiológica adicionada a Tween 80, na qual foi dissolvida a quercetina.

- 3) Grupo diabético (db): receberam somente solução fisiológica (NaCl 0,9%).
- 4) Grupo diabético+quercetina (db+q): receberam solução fisiológica adicionada a Tween 80, na qual foi dissolvida a quercetina.

Foram estudados os quatro grupos mencionados acima para as análises dos marcadores do estresse oxidativo [substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL)], bem como para a atividade das enzimas antioxidante SOD, CAT e GPx. A relação GSSG/GSH também foi realizada com os quatros grupos de animais. A análise dos IKKs, I $\kappa$ Bs, NF- $\kappa$ B e iNOS não foram realizadas no grupo controle+quercetina (co+q), pois, em trabalhos anteriormente realizados em nosso laboratório e já publicados em revistas específicas, os animais controle que receberam a quercetina na dose de 50 mg/Kg de peso corporal apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle (PERES, et. al., 2000; PAVANATO, et. al., 2003 e MOREIRA, et. al., 2004).

### **3.3 MARCAÇÃO E PESAGEM**

No início do estudo, os animais foram marcados no lóbulo da orelha e pesados individualmente. Os animais que receberam a injeção de STZ foram mantidos em gaiolas individuais para verificar uma possível alteração comportamental até a verificação da 1<sup>a</sup> glicemia. Foi registrado o peso corporal inicial (momento da indução) e durante todo o período do estudo (semanalmente), bem como no momento do sacrifício. Foi utilizada uma balança da marca Sartorius<sup>®</sup>, com peso em gramas para a pesagem dos animais.

### **3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

#### **3.4.1 Indução do DM**

O DM foi induzido por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de estreptozotocina - STZ (*Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA*) na dose de 70 mg/Kg de peso corporal (TAKEUCHI, et. al., 1994). A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e ácido cítrico (0,1M, pH 4,5) e administrada na região abdominal esquerda do animal cerca de 10 minutos após a diluição em solução tampão. Os animais do grupo

controle receberam somente NaCl 0,9% i.p. no mesmo volume do tampão utilizado para dissolver a STZ. O período do estudo foi de 60 dias, a contar do dia em que os animais diabéticos apresentaram uma glicemia sanguínea acima de 250 mg/dL. A quercetina foi administrada somente após a determinação da hiperglicemia. No 60º dia, os animais foram sacrificados, e retirado o fígado para posteriores análises.

### 3.4.2 Quercetina

A quercetina (C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) utilizada foi da marca *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, Missouri) na dose de 50 mg/Kg de peso corporal. A droga foi preparada em sala escura e imediatamente administrada nos animais, pois é fotossensível e, com a presença da luz, poderia haver alteração da estrutura química. Para ser administrada intraperitonealmente, foi adicionada à quercetina 2 gotas de Tween 80 e água Milli-Q. Depois de misturá-las e alcançar o volume necessário para cada animal, foi injetada diariamente na região abdominal esquerda dos animais. O grupo controle recebeu uma injeção diária de NaCl 0,9% desde o início até o final do estudo (60º dia) na mesma região. Uma vez por semana todos os animais foram pesados e calculada a dose a ser administrada semanalmente.

### 3.4.3 Obtenção do plasma e determinação da glicemia

O sangue foi retirado do animal através do seio orbital e colocado em tubo de ensaio com heparina (Liquemine®), para evitar a coagulação. Centrifugou-se o material em 4.000 rpm pelo tempo de 10 minutos. O precipitado foi desprezado, e o plasma retirado com pipeta (*Labsystems* 4500, 200-100 µL) para ser congelado em freezer à temperatura de -70º C para posterior determinação da glicose sangüínea. Para isto, foi utilizado o teste enzimático colorimétrico (Kit ENZI-COLOR, Bio Diagnóstica), no qual um reagente foi misturado a 20 µL de amostra do plasma e lido em espectrofotômetro (CARY 3E-UV- *Visible Spectrophotometer Varian*) com comprimento de onda de 500 nm. Foram considerados diabéticos aqueles animais que apresentavam a concentração de glicose sangüínea acima de 250 mg/dL (PACKER & FUCHS, 2000). Esse procedimento foi realizado a cada 15 dias a partir da determinação da hiperglicemia e, foi intercalado pela

análise da glicose sangüínea pelo método de fitas (hemoglicoteste-HGT). Este também foi realizado no intervalo de 15 dias.

### 3.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS

#### 3.5.1 Sacrifício dos animais

Após o 60<sup>o</sup> dia de administração da quercetina i.p., os animais foram pesados e anestesiados com uma mistura de cetamina (ketamina<sup>®</sup> 100mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg de peso corporal). Os anestésicos foram administrados intraperitonealmente na região abdominal esquerda. Retirou-se sangue do seio orbital para determinação da glicose sangüínea e realizou-se uma laparotomia na linha abdominal média, sendo o fígado colocado sobre uma gaze limpa e humedecida com solução fisiológica. Em seguida foi retirado o órgão para as análises estabelecidas, e os animais anestesiados foram sacrificados por exsangüinação.

#### 3.5.2. Preparo do Homogeneizado Fresco

O tampão utilizado para o homogeneizado do tecido hepático foi o tampão fosfato (KCl 140mM + fosfato 20mM, pH 7,4):

##### Solução A:

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .1H <sub>2</sub> O .....	27,6 g
H <sub>2</sub> O destilada... ..	1000 mL

##### Solução B:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	35,5 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000 mL

##### Tampão:

Solução A.....	95mL
Solução B .....	405 mL
KCl .....	10,43 g
H <sub>2</sub> O destilada.....	1000 mL

Colocou-se 9 mL de tampão fosfato (KCl 140 mM, fosfato 20 mM, pH 7,4) por grama de tecido, que foi homogeneizado em Ultra-Turrax (*IKA-WERK*) pelo tempo de 40 segundos à temperatura de 0-4° C. Esse homogeneizado foi centrifugado refrigeradamente (*SORVALL RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge*) por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g) (BUEGE e AUST, 1978). O precipitado foi desprezado, e o sobrenadante retirado e congelado em freezer na temperatura de -70 °C para posteriores dosagens.

### **3.5.3. Obtenção da fração citosólica**

Foi homogeneizado um grama de fígado em 4 mL de tampão fosfato sódico (0,2 M; pH 6,5) e centrifugado a 100.000 x g durante 60 minutos a 4°C. A fração citosólica coletada foi o sobrenadante.

Também foi preparado um homogeneizado especial, para determinar a atividade da SOD citosólica: homogeneizou-se 1g de tecido em 10mL de tampão manitol 0,25 M, sacarose 70 mM, EDTA 2mM e pH 7,4. Centrifugou-se o homogeneizado a 754 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspensão no mesmo tampão e repetida a centrifugação. Centrifugou-se o sobrenadante retirado anteriormente a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido foi centrifugado a 100.000 x g durante 1 hora a 4°C.

### **3.5.4. Obtenção da fração mitocondrial**

Ressuspendeu-se o precipitado obtido na centrifugação anterior (12.000 x g durante 10 minutos a 4° C), em 4 mL de tampão manitol 0,25 M, sacarose 70 mM e Hepes 3 mM, pH 7,4, foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. O precipitado mitocondrial foi ressuspensão em 1,5 mL de tampão sacarose 0,25 M, EDTA 2 mM e pH 7,4.

## **3.6 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO**

### **3.6.1 Quantificação das proteínas**

A concentração das proteínas do homogeneizado hepático foi determinada através do método de Lowry e colaboradores (1951). Esse método utiliza como padrão uma solução de 1 mg/mL de albumina bovina (Sigma<sup>®</sup>), utilizaram-se volumes de 50, 100 e 150 µL. Colocou-se uma alíquota do homogeneizado (20 µL) em 780 µL de água destilada e 2,0 mL de reativo C. Este último foi preparado somente no momento que seria utilizado e consistiu na mistura de 50mL de NaHCO<sub>3</sub>, somado a 0,5 mL do **reativo B1** (CuSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 1%) e 0,5 mL do **reativo B2** (tartarato de sódio e potássio 2%). Após a adição do **reativo C**, foram aguardados 10 minutos e colocou-se 0,2 mL do reativo Folin-Ciocalteu 2N (Laborclin), na concentração de 1:3 em água destilada. Após 30 minutos, a solução apresentou coloração azulada que pôde ser medida num espectrofotômetro com comprimento de onda de 625 nm.

### 3.6.2 Avaliação da lipoperoxidação (LPO)

Neste estudo foram utilizados dois métodos para a avaliar a lipoperoxidação. Um deles quantifica os produtos da LPO que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este é considerado uma mensuração indireta da LPO, pois nem todo o malondialdeído e outros aldeídos produzidos nas diversas reações corporais são necessariamente oriundos da peroxidação dos lipídios da membrana.

O outro método utilizado para quantificar a LPO foi a quimiluminescência (QL), que avalia a capacidade de resposta da amostra frente a adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética. A QL é considerada um método bastante sensível para avaliação da LPO.

#### 3.6.2.1 Determinação dos produtos que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A técnica de TBARS consiste em medir espectrofotometricamente, sob condições ácidas, os níveis de peroxidação lipídica mediante a quantificação dos aldeídos formados pela degradação dos hidroperóxidos, incluindo o malondialdeído (BUEGE e AUST, 1978). Colocou-se, na seguinte ordem de adição, num tubo de ensaio 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, 0,5 mL do homogeneizado, 1,0 mL de ácido tiobarbitúrico

(TBA) a 0,67% e 0,5 mL de água destilada para atingir o volume adequado. Posteriormente agitou-se cada tubo e fez-se a incubação em 100°C por 15 minutos. Após a fervura, observou-se a formação de um produto corado. Os tubos foram resfriados em gelo, e acrescentaram-se 3,0 mL de butanol. Depois disso, foram colocados em agitador (Biomatic) por 45 segundos cada tubo e centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm (1110 x g). O sobrenadante foi colocado na cubeta do espectrofotômetro (CARY 3E–UV–Visible Spectrophotometer Varian) para a leitura num comprimento de onda de 535 nm. A concentração do malondialdeído foi expressa em nmoles por mg de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $1,55 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 3.6.2.2 Determinação da Quimiluminescência (QL)

O método consiste em adicionar um hidroperóxido orgânico de origem sintética (hidroperóxido de tert-butil) ao homogeneizado de tecido. Avalia-se a capacidade de resposta mediante a determinação da quimiluminescência (QL) produzida pela reação.

Em tecidos expostos ao estresse oxidativo, o valor da QL iniciado por hidroperóxido de tert-butila (t-BOOH) é maior que o valor correspondente ao tecido em condições basais. A QL foi medida em um contador com o circuito de coincidência desconectado, utilizando-se o canal de trítio (*Liquid Scintillation Correnter*, 1209 Rack beta, LKB WALLAR). Os homogeneizados de tecido (0,5 mL) foram colocados em viais de vidro de 25 mm de diâmetro por 50 mm de altura. Para evitar a fosforescência dos viais, ativada pela luz fluorescente, foram conservados na obscuridade até o momento do uso e as mensurações foram realizadas em sala escura. As condições da reação, consistem numa solução reguladora de KCl 120 mM; fosfato 40 mM, pH 7,4, cuja concentração de proteínas do homogeneizado é, aproximadamente, 1mg/mL, na concentração de t-BOOH 3mM (30µL). Os resultados foram expressos em contas por segundo (cps) por mg de proteína (GONZALEZ-FLECHA, et al., 1991).

Para cálculo da QL, foi considerada a emissão máxima iniciada por t-BOOH (QL Máxima), descontada a emissão basal que corresponde ao homogeneizado mais o tampão (QL Mínima).

### 3.6.3 DETERMINAÇÃO DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 3.6.3.1 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade dessa enzima é definida pela capacidade que possui em inibir um sistema de detecção que reage com o  $O_2^{\bullet-}$  (MIRSA e FRIDOVICH, 1972).

A reação catalisada é a seguinte:



A técnica de medida da SOD citosólica está baseada na inibição dessa reação. Para isto, utilizou-se a adrenalina que, no meio alcalino, transformou-se em adrenocromo, produzindo  $O_2^{\bullet-}$  que é o substrato da enzima.

Iniciou-se a medida do meio de reação (glicina-NaOH 50mM, pH 9,6), com 50  $\mu$ L de adrenalina (60 mM, pH 2,0), o que corresponde a 100% da reação. Considerando que a adrenalina permanece estável em soluções ácidas e espontaneamente se oxida em soluções básicas, favorecendo a formação de adenocromo, a SOD pôde ser medida espectrofotometricamente com o comprimento de onda de 480nm. Posteriormente, foram adicionados diferentes volumes do homogeneizado e mediu-se a inibição da reação. A atividade enzimática foi expressa em unidades de SOD/g de tecido (quantidade de SOD que é capaz de inibir em 50% a velocidade de redução da adrenalina).

#### 3.6.3.2 Avaliação da atividade da Catalase (CAT)

A atividade da catalase foi determinada pelo método descrito por Chance em 1954 (AEBI,1984). A catalase é uma hemoproteína peroxissomal que realiza a catálise do peróxido de hidrogênio, formando água e oxigênio molecular (LLESUY, 2002).



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

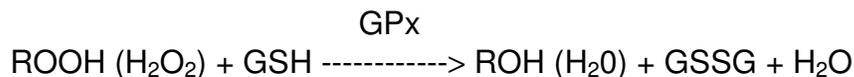
Processo de Realização: a mistura de incubação continha um volume final de 1000 $\mu\text{L}$  com os seguintes reagentes:

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

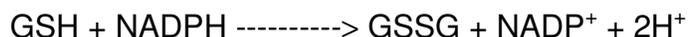
Na cubeta de quartzo foram adicionados 955 $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e 25 $\mu\text{L}$  de amostra do tecido hepático, os quais foram colocados no aparelho e descontado o branco. Foram adicionados 20 $\mu\text{L}$  do peróxido de hidrogênio e realizaram-se leituras em 240nm. Os resultados foram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

### 3.6.3.3 Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A determinação da glutationa peroxidase selênio dependente, mediante o método de Guntzler e Flohé (1985), consiste em medir a velocidade de consumo do NADPH em um sistema que contenha GSH, sendo que a oxidação se registra espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm.



A atividade da GPx pode ser estudada, medindo a velocidade de consumo de NADPH num sistema que contenha GSH.



A técnica consiste em determinar a atividade da enzima espectrofotometricamente medindo a velocidade de oxidação do NADPH em uma reação. Em uma cubeta de quartzo foram colocados 2,7 mL de solução reguladora de fosfatos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (100 mM, pH 7,0) com 50  $\mu\text{L}$  de NADPH (10mM), 150  $\mu\text{L}$  de BOOH (10mM) e 50  $\mu\text{L}$  de glutationa redutase (12 U/mL). A mistura foi lida durante 1 minuto, fez-se uma linha de base e em seguida foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de GSH (100mM) e 50  $\mu\text{L}$  do homogeneizado. As

amostras foram incubadas a 25°C durante 5 minutos, e lidas numa absorvância de 340 nm. A atividade foi expressa em  $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{g}$  de tecido.

#### **3.6.4 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)**

Esse método descrito por Hissin e Hilf (1976) consiste na reação da GSSG e da GSH com o optalaldeído [OPT]- (pH 12 e 8,0, respectivamente) formando um produto altamente fluorescente, que se ativa a 350 nm com pico de emissão de 420 nm. As amostras hepáticas foram homogeneizadas em solução de tampão fosfato sódico-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) na concentração de 0,1 M e pH de 12 para GSSG e 8,0 para GSH. Posteriormente foram centrifugadas a 100.000 x g por 30 minutos a 4° C. Do sobrenadante foram retiradas alíquotas de 0,5 mL que foram diluídas em 4,5 mL do mesmo tampão. A mistura de incubação foi de 100  $\mu\text{L}$  do homogeneizado diluído com 1800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato sódico-EDTA (pH 12 e 8,0) mais 100  $\mu\text{L}$  de OPT (7,5  $\mu\text{M}$ ), incubando-se pelo tempo de 15 minutos. As amostras foram lidas em fluorescência com excitação a 350 nm e emissão de onda de 420 nm. Para calcular a concentração de glutatona elaborou-se uma curva padrão construída com concentrações crescentes de GSH (0,81 a 16,27 mM), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}/\text{g}$  de tecido.

#### **3.6.5 ATIVAÇÃO DO NF- $\kappa$ B (*ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY - EMSA*)**

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) foi realizada segundo o método descrito por Essani e colaboradores (1996), que consiste na separação eletroforética do complexo formado pelo NF- $\kappa$ B e de uma sonda específica de DNA marcada radiativamente (ESSANI, et. al., 1996),

O método consistiu de várias etapas:

##### **1. Marcação de uma sonda específica**

Foi utilizado um oligonucleotídeo com seqüência para o NF- $\kappa$ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGCC-3' - Promega, Madison, USA) marcado com  $^{32}\text{P}$ (ATP),

ao qual foi adicionado, em tubo de *Eppendorf* a 4 °C, a seguinte mistura reativa:

- 9,5 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q.
- 5,7 µL de oligonucleotídeo para NF-κB.
- 2,5 µL de tampão 10x T4 PNK.
- 5,3 µL (10 pmol) e<sup>-32</sup> P(ATP).
- 2 µL da enzima T4 PNK.

Após agitar a mistura, ela foi incubada a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, a fim de deter a reação e purificar o oligonucleotídeo, foram adicionados na seguinte ordem: 2,5 µL de EDTA sódico (0,1 M), 12,5 µL de acetato de amônia (3 M) e 80 µL de etanol absoluto. Incubou-se a -20 °C durante 30 minutos, depois centrifugou-se a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Foi descartado o sobrenadante, e o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de etanol a 70%. Incubou-se novamente durante 20 minutos a -20 °C. Transcorrido este tempo, voltou-se a centrifugar durante 15 minutos a 12.000 x g a 4 °C. Eliminou-se o sobrenadante, ressuspendendo o precipitado em tampão TE (10 mM Tris/HCl e 1 mM EDTA pH 8,0). O material foi armazenado a -20 °C durante um período inferior a 15 dias.

## **2. Reação da união com o DNA**

Elaborou-se a seguinte mistura reativa:

- 5 µL de tampão de incubação (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 40 mM NaCl, 1mM EDTA e glicerol 4%).
- 1 µL de Poli (dl-dC).
- 13 µg proteína provenientes dos extratos nucleares de cada amostra.
- H<sub>2</sub>O Milli-Q até completar um volume final de 25 µL.

Após a mistura ficar 15 minutos em gelo, adicionou-se 2 µL do oligonucleotídeo marcado (aproximadamente 30.000 c.p.m.) e incubou-se à temperatura ambiente durante

20 minutos.

### 3. Separação eletroforética

Para preparar o gel, foram encaixados vidros limpos de impurezas e realizada a seguinte mistura:

- 4 mL de acrilamida/bisacrilamida (29:1).
- 15 mL de H<sub>2</sub>O.
- 200 µL de persulfato de amônia.
- 10 µL de TEMED.

Uma vez preparada a mistura, introduziu-se cuidadosamente entre os vidros a sonda para formar as amostras, deixando polimerizar por uma hora. Posteriormente foram introduzidos os vidros na cubeta de eletroforese, carregando-a com TBE 0,25x. Após adicionar 2 µL de azul de bromofenol nas misturas radioativas provenientes de cada amostra, foi carregado o gel. A eletroforese foi realizada com 150 (V) a 4 °C durante duas horas. Finalizada a eletroforese o gel foi extraído cuidadosamente e transferido para papel tipo *Whatman*<sup>®</sup>, colocando-o no interior de um filme de revelação de alta sensibilidade (*Amersham Pharmacia*, Piscataway, USA). Depois de revelado o filme, realizou-se a quantificação por densitometria, utilizando o programa *Scion Image*, com resultados expressos em relação à porcentagem do controle (100% ou 189735 pixels).

#### 3.6.6 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA DO IKK- $\alpha$ , IKK- $\beta$ , I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$ E DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS)

##### Fundamento

A técnica utilizada foi a de *Western blot* utilizando o sistema descrito por Laemmli (1970).

##### Método

Em primeiro lugar, realizou-se um homogeneizado com 1 g de fígado em 5 mL

de tampão de lise (NaCl 140 mM, EDTA 15 mM, glicerol 10%, Tris 20 mM; pH 8,0), ao qual adicionou-se uma mistura de inibidores de proteases (PMSF, aprotinina e inibidor de tripsina). O homogeneizado foi incubado durante 30 minutos à 4 °C, sendo centrifugado durante 30 minutos à 13.000 xg e 4 °C, retirando-se o sobrenadante em alíquotas.

Posteriormente foi selecionada uma quantidade de amostra equivalente à 50 µg de proteína, onde se adicionou a solução (H<sub>2</sub>O, tris/HCl 0,5 M, DTT 1% e azul de bromofenol), sendo incubada durante 5 minutos a 100 °C. Após realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida a 9-12% em tampão de eletroforese (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 3,5 mM; pH 8,8).

Após separadas, as proteínas foram transferidas para o gel de nitrocelulose a fim de permitir a sua exposição aos anticorpos. Uma vez extraído o gel, este foi equilibrado num tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 0,2M e metanol 20%). O procedimento foi realizado em 13 volts (V) durante 25 minutos. A fim de verificar o procedimento foi introduzida na membrana de nitrocelulose uma solução de vermelho Ponceau para visualizar as proteínas totais. A membrana foi lavada com agitação durante 5 minutos com água e durante outros 5 minutos com PBS (0,14 M NaCl, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,7 mM KCl). Depois foi colocada durante 30 minutos em solução de bloqueio (4% de leite em pó desnatado em PBS-Tween frio) a 37°C.

A membrana foi incubada durante uma noite com anticorpos específicos para as proteínas, as diluições utilizadas para cada anticorpo foram: IKK- α: 1/200 em leite a 2%; IKK-β: 1/200 em leite a 2%; IκB-α: 1/400 em leite a 2%; IκB-β: 1/400 em leite 2% e iNOS: 1/300 em leite a 4%. Após este período, ela foi lavada cinco vezes com PBS-Tween. Posteriormente foi incubada durante uma hora e meia com anticorpo anti-imunoglobulina de coelho unido à HRP (DAKO A/S, Glostrup, Dinamarca). Transcorrido este tempo, a membrana foi lavada cinco vezes em PBS-Tween.

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

Após a secagem do filme, as bandas foram quantificadas por densitometria,

utilizando o programa *Scion Image 4.02* para Windows (*Scion Corporation*, Frederick, USA), os resultados foram expressos em relação à percentagem do controle (100% ou 189735 pixels).

### 3.6.7 ESTUDO HISTOLÓGICO

Os fragmentos do fígado dos animais dos diferentes grupos estudados foram retirados após o sacrifício e colocados em Bouin. Oito horas após, foram lavados com água destilada e imersos em álcool a 70%. Após seis horas, foram lavados e mantidos em álcool a 50% até o processamento das lâminas. A seguir, as amostras foram colocadas no histotécnico para a primeira e segunda impregnação em parafina. Após duas horas, foram incluídos em blocos de parafina. Uma vez montados os blocos de parafina, eles foram cortados por um micrótomo em secções seriadas com espessura de 3 micra. A seguir, realizou-se a coloração de Hematoxilina-Eosina. A leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 200x. As lâminas foram observadas por um patologista que não tinha prévio conhecimento dos grupos a serem avaliados.

### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a determinação de todos os parâmetros experimentais, os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) para cada grupo experimental.

Para a análise estatística foi utilizado o programa estatístico *Statistical Package for Sciences*, versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Na avaliação paramétrica dos dados foi utilizado o método de Bartlett. A avaliação da normalidade (Distribuição Gaussiana) dos dados foi realizada com o emprego do teste de normalidade Kolmogorov e Smirnov.

Para os dados pareados utilizou-se a análise de variância simples (ANOVA), a fim de comparar as diferenças observadas em cada parâmetro estudado. Foi aplicado também o teste complementar de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.

Ao se afirmar no texto que existe diferença estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas, utilizou-se o nível de significância de cada uma delas de, pelo menos, 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4 - RESULTADOS**

---

## 4 - RESULTADOS

---

Os resultados apresentados neste estudo são referentes a todos os grupos avaliados e terão a seguinte ordem:

- 1- Peso corporal (inicial e final) e glicose sangüínea.
- 2- Marcadores do estresse oxidativo [(substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e quimiluminescência (QL))].
- 3- Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx).
- 4- Níveis citoplasmáticos de glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e a relação GSSG/GSH.
- 5- Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B).
- 6- Níveis citoplasmáticos hepáticos do complexo IKK (IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ ), bem como dos inibidores (I $\kappa$ Bs) do NF $\kappa$ -B (I $\kappa$ B- $\alpha$  e I $\kappa$ B- $\beta$ ).
- 7- Expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática.
- 8- Avaliação histológica do fígado nos diversos grupos.

Cabe ressaltar que, para a análise dos I $\kappa$ Bs, IKKs, NF- $\kappa$ B e iNOS não foi realizado um grupo com animais controles que receberam a quercetina intraperitoneal (co+q), pois em trabalhos anteriormente realizados por nosso laboratório e publicados em revistas específicas não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar estes animais com o grupo controle.

### 4.1 PESO CORPORAL E GLICOSE SANGUINEA

Após oito semanas de duração do estudo o peso corporal dos animais diabéticos reduziu em relação ao grupo controle em torno de 28,1%, com nível de significância de  $p < 0,05$ . Ao analisar o grupo controle e controle que recebeu a quercetina, o peso corporal aumentou 29,1 e 29,9%, respectivamente, quando comparado o valor inicial com o encontrado no 60º dia. Ainda em relação ao peso corporal, no final do estudo, ao comparar o grupo diabético com o diabético que

recebeu a quercetina, não houve uma diferença estatisticamente significativa entre os animais. Mas, ao comparar o último grupo com o grupo controle, o peso corporal diminuiu 31,9% após as oito semanas ( $p < 0,05$ ).

A glicose sangüínea apresentou elevação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) ao comparar o grupo controle com o diabético (338,9%) na oitava semana de estudo. No mesmo período, os animais diabéticos que receberam a quercetina também apresentaram uma elevação de 251,1% em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), mas a glicose sangüínea reduziu 25% em relação ao grupo diabético. Essa última comparação não apresentou diferença estatisticamente significativa. Todas as variáveis podem ser observadas na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Peso corporal e concentração da glicose sangüínea nos diferentes grupos estudados.

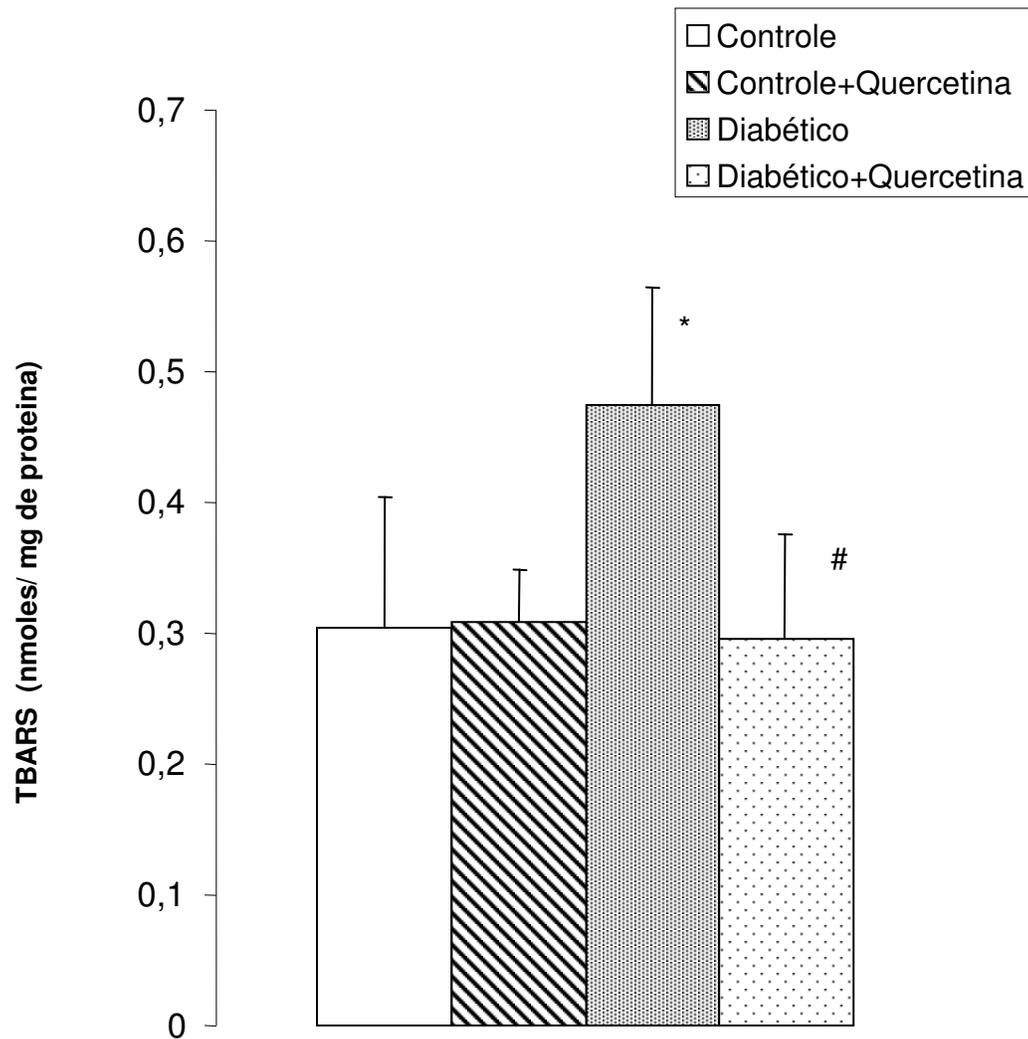
Variáveis/ grupos	Controle	Controle+ Quercetina	Diabético	Diabético + Quercetina
Peso inicial (g)	214 ± 11	223 ± 22	184 ± 22	219 ± 28
Peso final (g)	302 ± 22	318 ± 26	217 ± 21*	229 ± 48*
Glicose (mg/dL)	131 ± 20	122 ± 18	575 ± 150*	460 ± 89*

Os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão da média (DP) de 8 animais em cada grupo.

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

#### 4.2 DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Os dois marcadores do estresse oxidativo (TBARS e QL) avaliados neste estudo apresentaram alterações significativas, principalmente entre o grupo diabético e o controle, e daquele com o diabético que recebeu a quercetina. As substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico aumentaram em torno de 56,2% nos animais diabéticos em relação ao controle ( $p < 0,05$ ), mas não apresentaram diferença significativa entre os animais controle e controle que receberam a quercetina. Após a administração da quercetina nos animais diabéticos, houve diminuição de 60,5% na lipoperoxidação hepática em relação ao grupo diabético ( $p < 0,05$ ). (**Figura 7**).

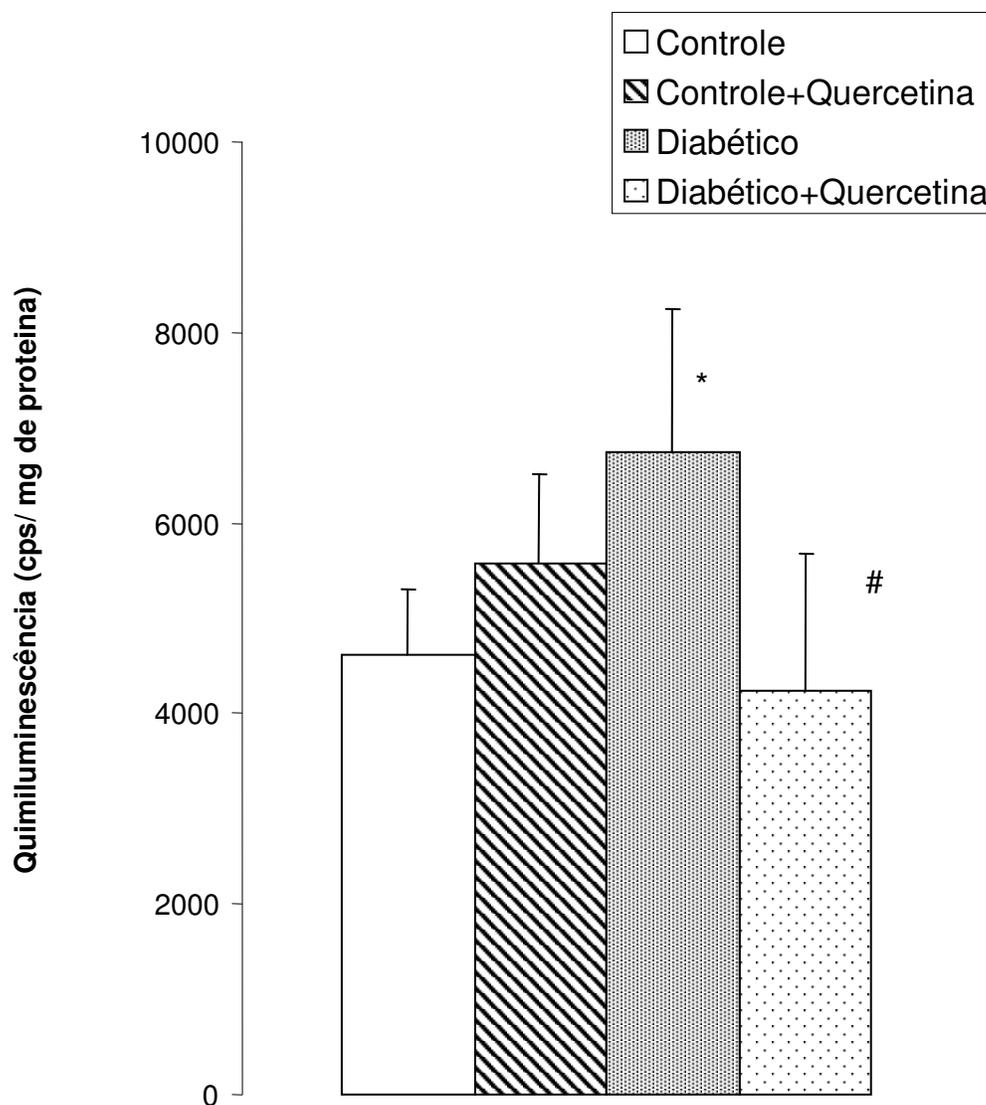


**Figura 7.** Medida das substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

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

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar a quimiluminescência do grupo diabético, houve aumento de 46,2% em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), e, após a administração da quercetina, houve redução de 58,7% ( $p < 0,05$ ). Ressalta-se que nos animais controle que receberam a quercetina, a QL aumentou 20,9% em relação ao grupo controle, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. **(Figura 8)**.



**Figura 8.** Medida da quimiluminescência (QL). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

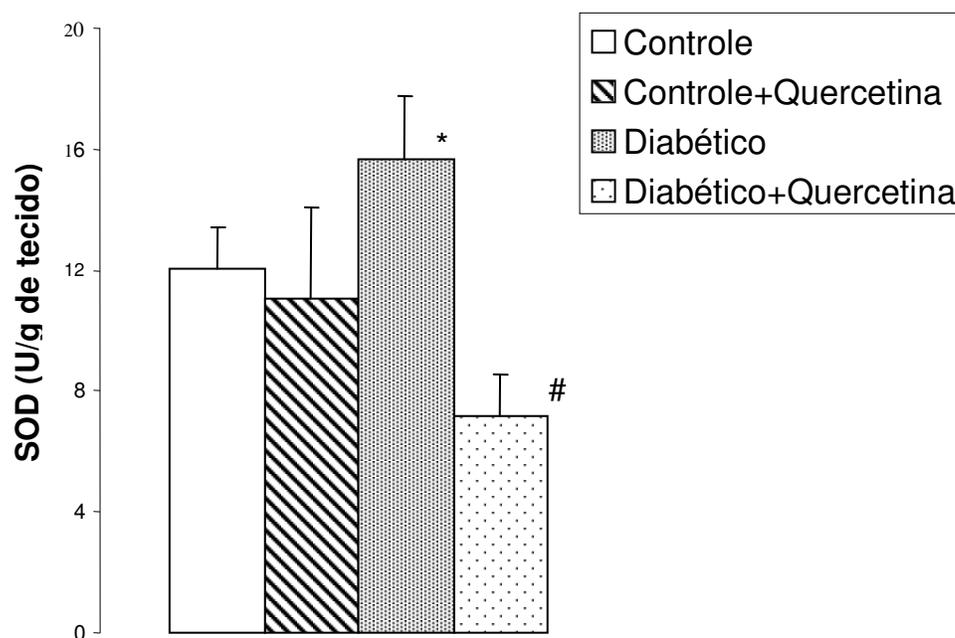
\* - diferença significativa entre o grupo controle e diabético ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 EFEITOS DO DIABETES MELLITUS INDUZIDO POR ESTREPTOZOTOCINA E DA QUERCETINA SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

#### 4.3.1 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Na **Figura 9**, podemos observar a atividade citosólica da enzima antioxidante SOD no homogeneizado de fígado nos diversos grupos avaliados. Houve aumento de 30,4% no grupo diabético quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), no qual, após a administração da quercetina nos animais diabéticos, a atividade diminuiu 118,8% quando comparado ao grupo diabético ( $p < 0,05$ ). Ao serem comparados com o grupo controle, os animais diabéticos que receberam a quercetina apresentaram diminuição de 40,4% na atividade da SOD ( $p < 0,05$ ).



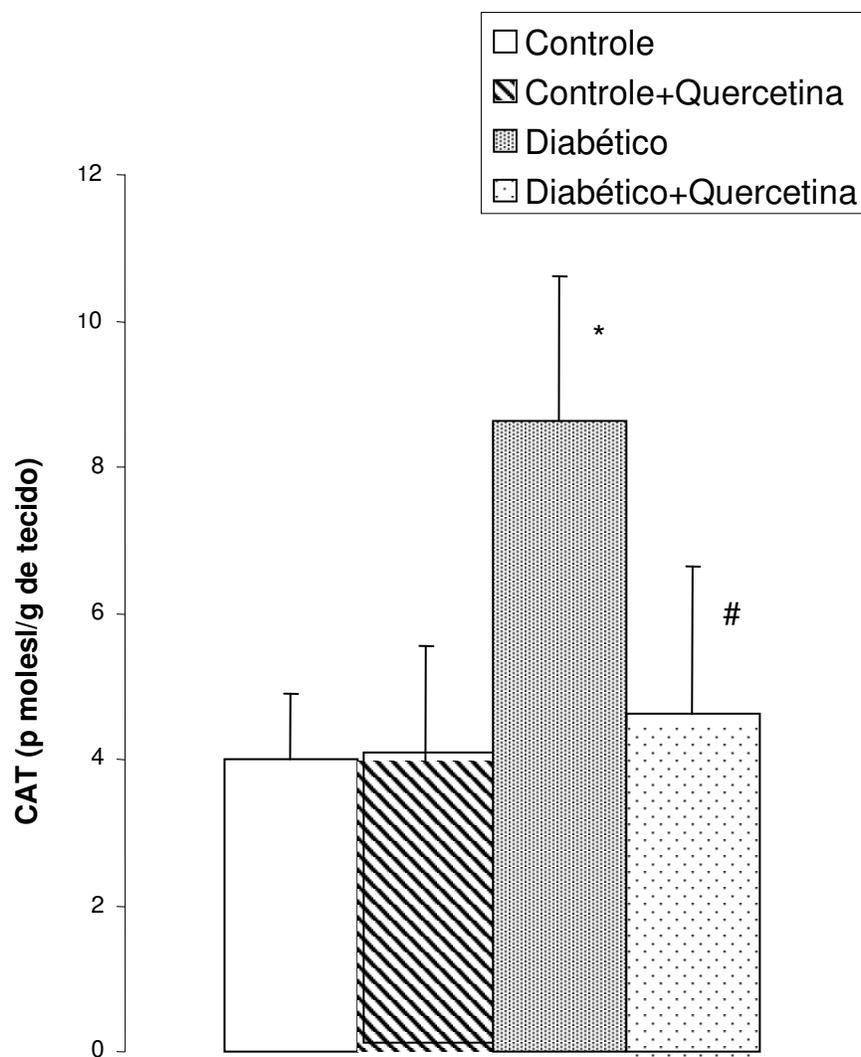
**Figura 9.** Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

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

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina, e deste com o controle ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.2 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

A atividade da enzima catalase aumentou 115,5% no grupo diabético em relação ao grupo controle, e entre o grupo diabético e o diabético que recebeu a quercetina, a atividade diminuiu 86,2%. Nas duas comparações houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). **Figura 10.**



**Figura 10.** Atividade da enzima catalase (CAT). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Os sinais representam as seguintes significâncias:

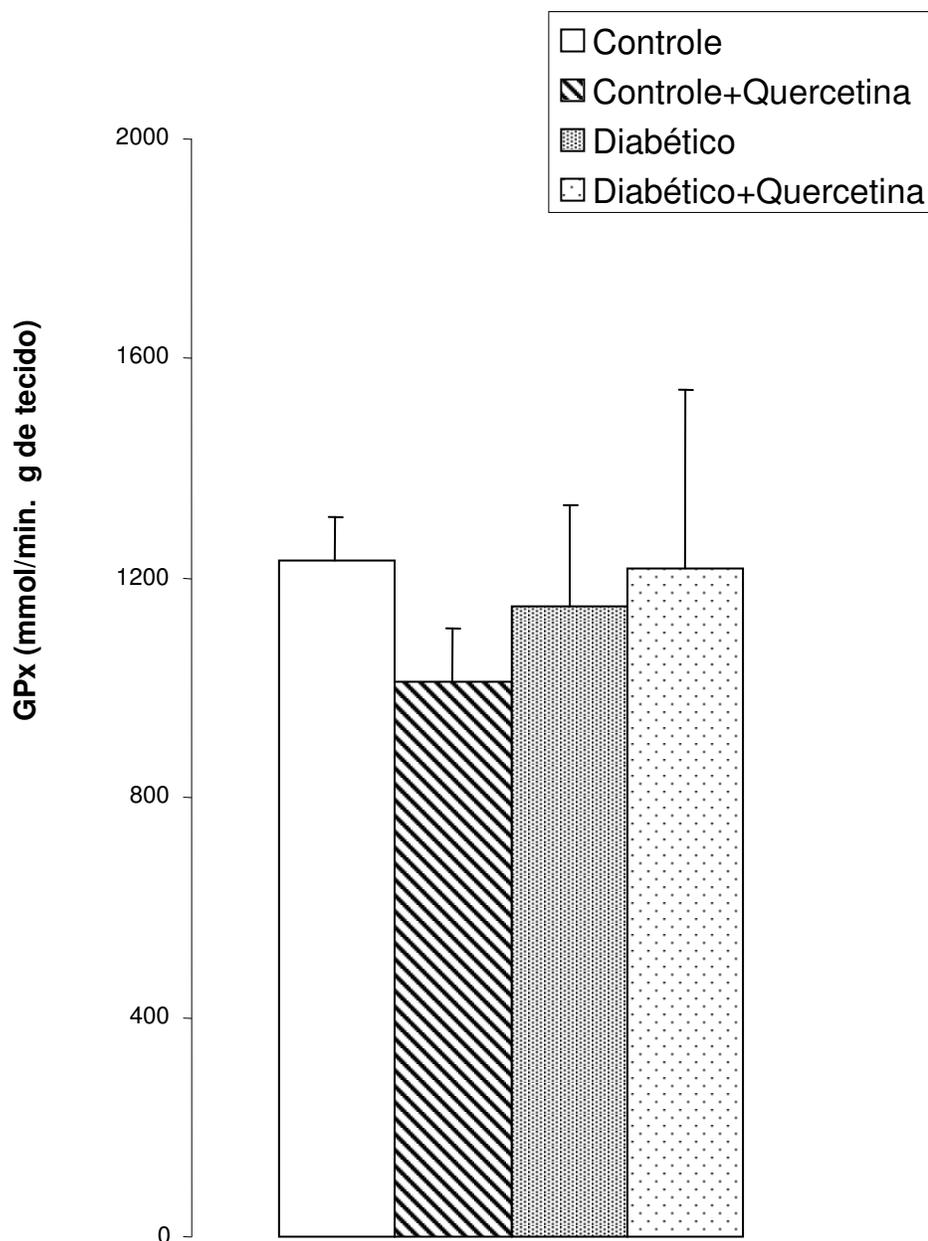
\* - diferença significativa entre o grupo controle e diabético ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx)

A atividade da enzima glutaciona peroxidase não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos avaliados neste estudo.

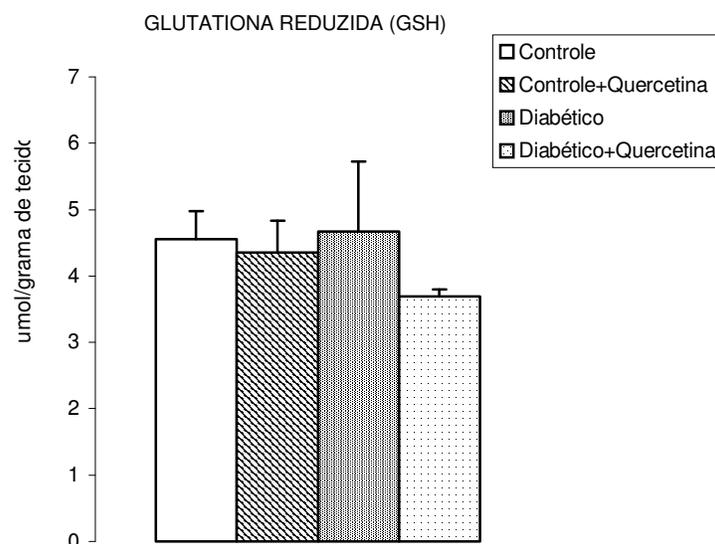
**Figura 11.**



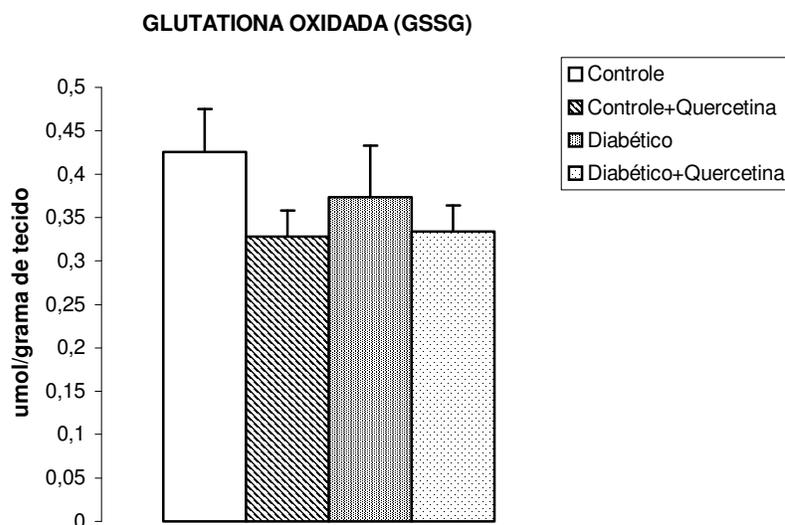
**Figura 11.** Atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) no tecido hepático. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

#### 4.4 NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), OXIDADA (GSSG), E RELAÇÃO GSSG/GSH

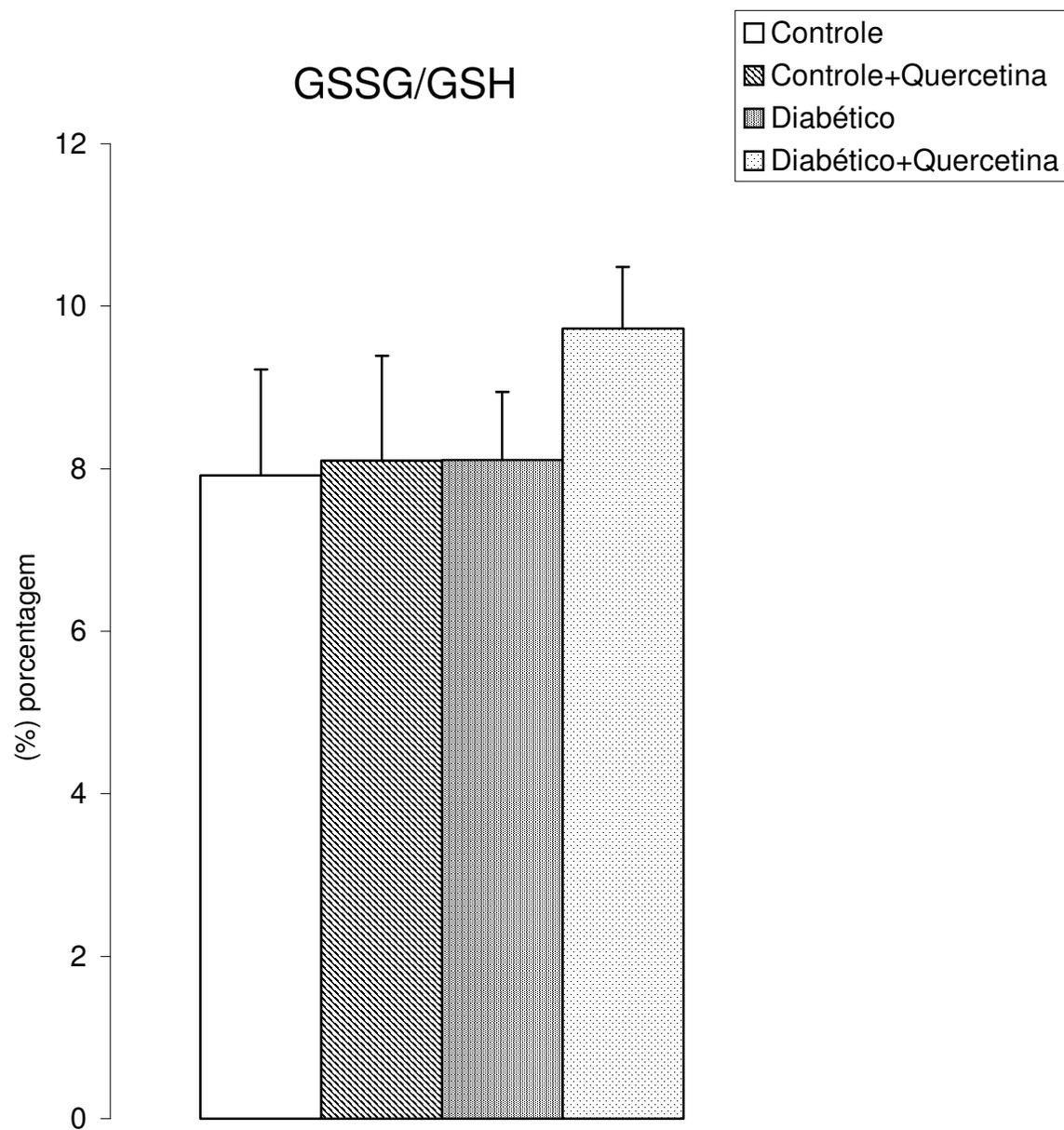
Não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos avaliados em relação à glutatona reduzida, glutatona oxidada, bem como na relação GSSG/GSH. **Figuras 12, 13 e 14.**



**Figura 12.** Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) no tecido hepático. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 13.** Conteúdo de glutatona oxidada (GSSG) no tecido hepático. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.



**Figura 14.** Relação da glutatona oxidada (GSSG) pela glutatona reduzida (GSH) no tecido hepático. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média (DP), para oito animais em cada grupo.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados.

#### 4.5 ATIVAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NF- $\kappa$ B)

A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) foi avaliada pelo método EMSA através da seqüência de nucleotídeos, e observa-se que os animais diabéticos apresentaram aumento na ativação estatisticamente significativo ao serem comparados com o grupo controle (71,4% maior), e, após a administração da quercetina nos animais diabéticos, houve diminuição de 65,8% ( $p < 0,05$ ). **Figura 15.**

#### 4.6 NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS HEPÁTICOS DO COMPLEXO IKK E DOS INIBIDORES DO NF- $\kappa$ B

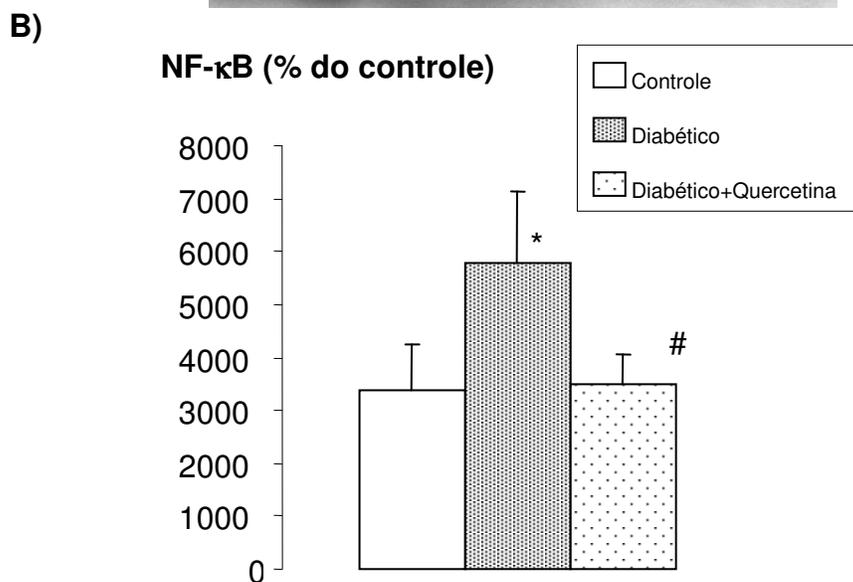
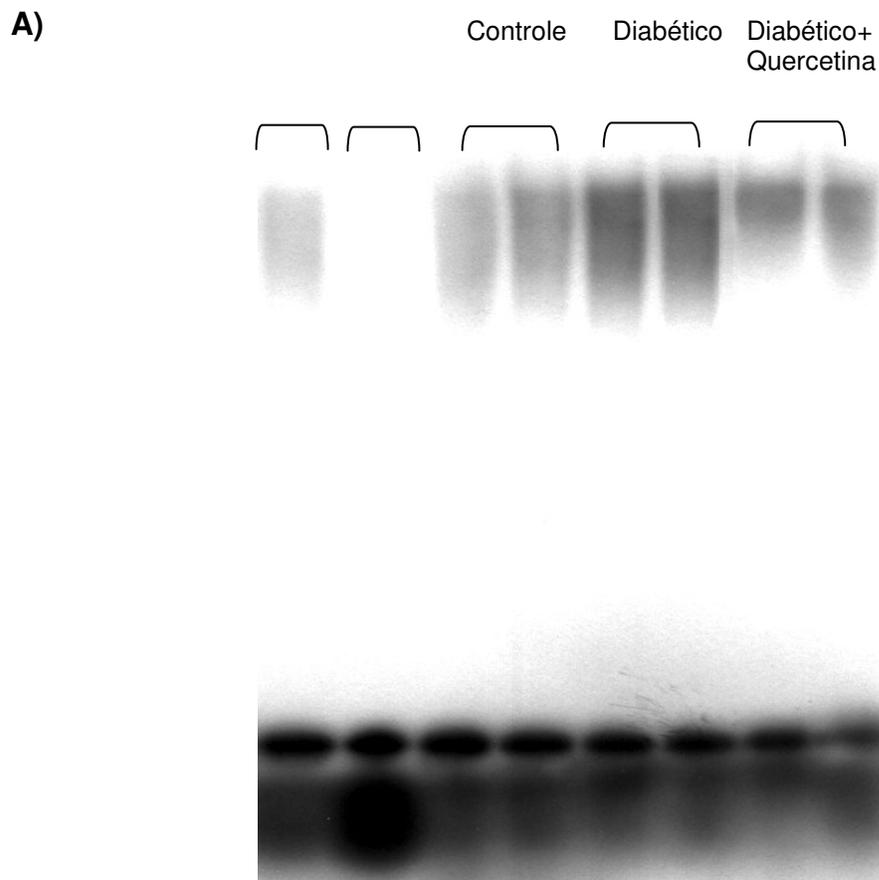
A **Figura 16** mostra os efeitos do DM e da quercetina sobre o complexo IKK e nos níveis de proteína intracelular dos I $\kappa$ Bs. O nível proteico do IKK $\cdot\alpha$  no grupo diabético aumentou 164,1% em relação ao controle, e diminuiu 62,8% no diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$  nas duas comparações). **Figura 16-1.**

Em relação ao I $\kappa$ B $\alpha$  observa-se diminuição de 46% no grupo diabético em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e, após a administração da quercetina nos animais diabéticos, os valores aumentaram 37,9% em relação ao diabético, quase alcançando os valores do controle. Também com diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). **Figura 16-3.**

Os níveis do IKK $\cdot\beta$  e do I $\kappa$ B $\cdot\beta$  não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle, diabético e diabético que recebeu a quercetina. **Figuras 16-2 e 16-4.**

#### 4.7 EXPRESSÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE INDUZÍVEL (iNOS) HEPÁTICA

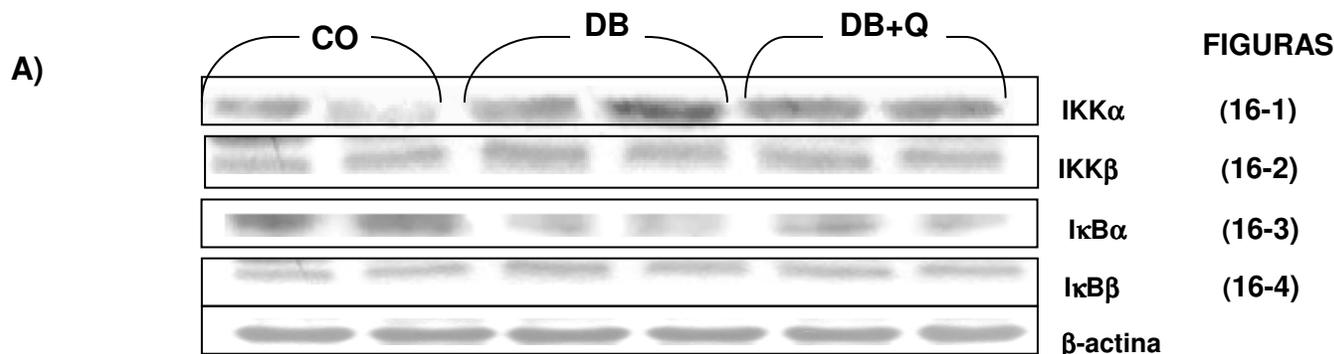
Na **Figura 17** são observados os resultados da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nos homogeneizados de fígado de animais controle, diabético e diabético+quercetina. Analisando os resultados do *Western blot*, observa-se aumento de 83,7% no grupo diabético ao compará-lo com o controle ( $p < 0,05$ ), sendo que no diabético+quercetina houve diminuição de 243,3% em relação ao diabético. Ao comparar o grupo diabético+quercetina com o controle a expressão diminuiu 46,5%. As duas comparações apresentam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).



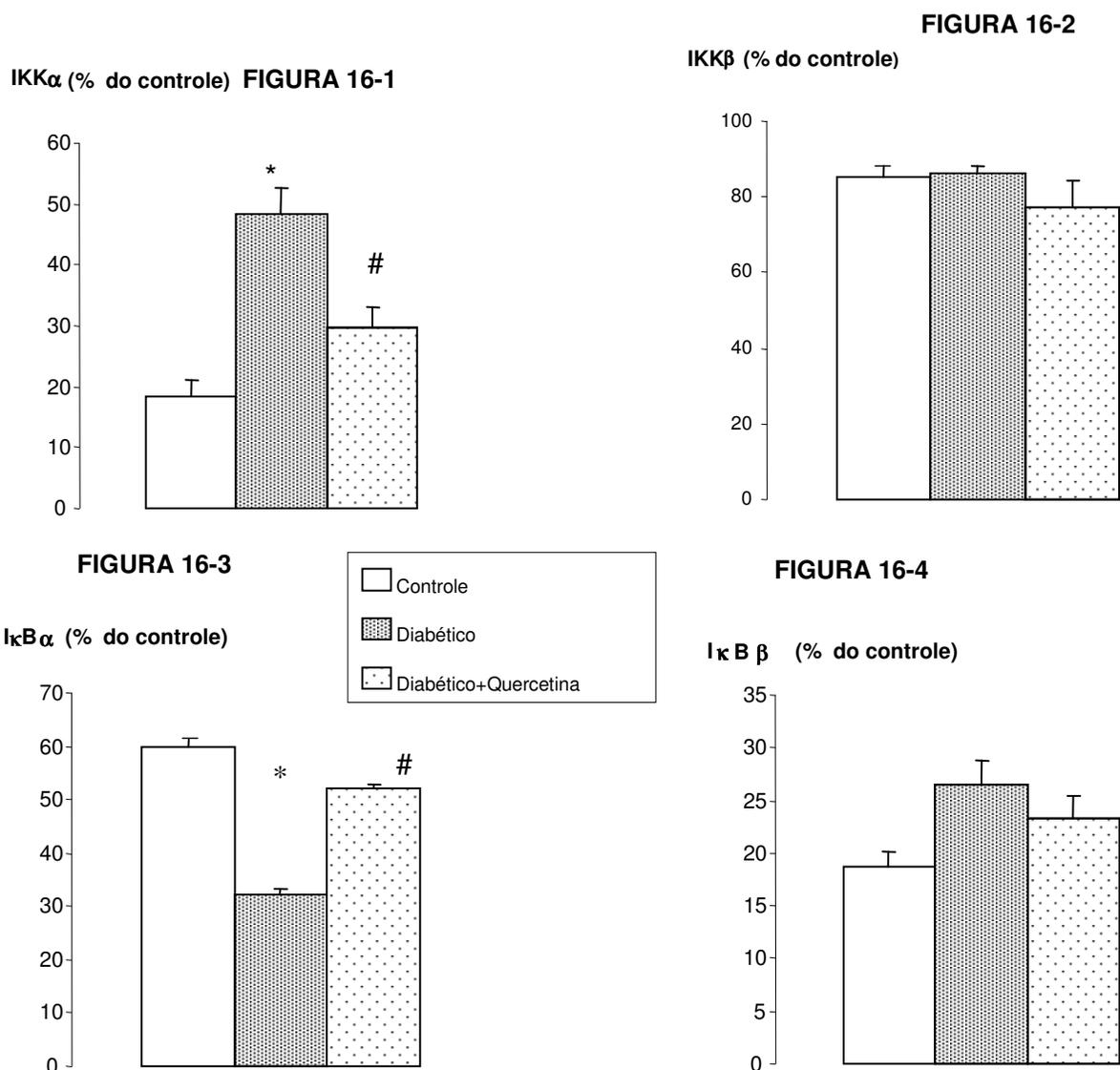
**Figura 15.** Ativação do fator de transcrição nuclear kappa B. (A) Representação da análise por EMSA. B) Valores expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de cinco diferentes observações.

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

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$ ).



**B)**

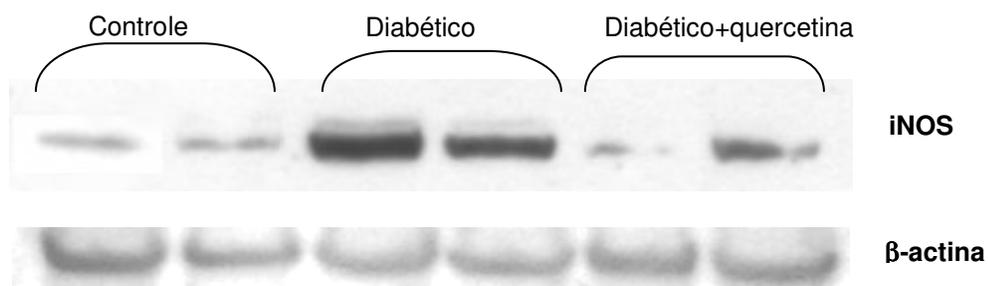


**Figura 16.** Análise das proteínas do complexo IKK e do I $\kappa$ Bs. (A) Representação do *Western blot*. (B) Valores expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de cinco diferentes observações.

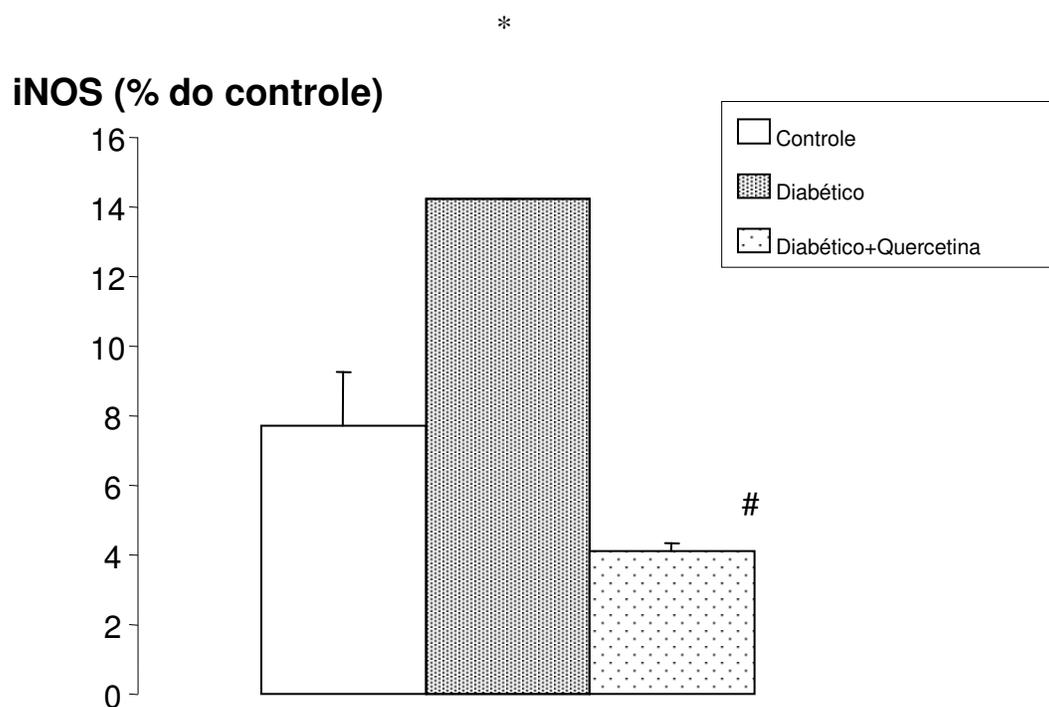
\* - diferença significativa entre o grupo controle e diabético ( $p < 0,05$ ).

# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina ( $p < 0,05$ ).

A)



B)



**Figura 17.** Expressão da iNOS no tecido hepático. (A) Representação do *Western blot*.

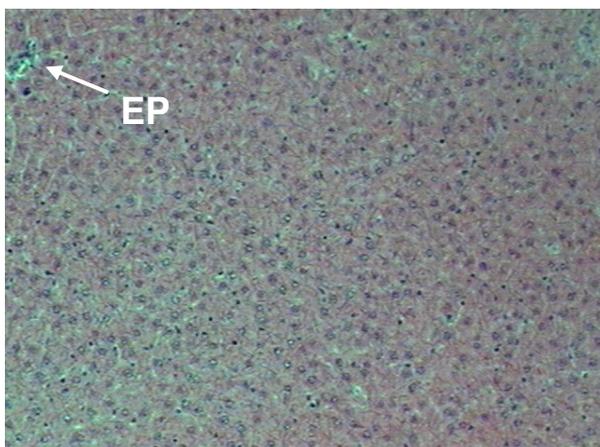
(B) Valores expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média (DP) de cinco diferentes observações.

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

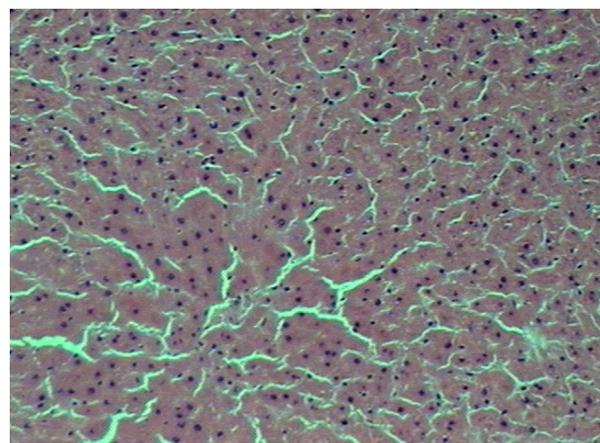
# - diferença significativa entre o grupo diabético e diabético que recebeu a quercetina, e deste com o grupo controle ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8 ESTUDO HISTOLÓGICO

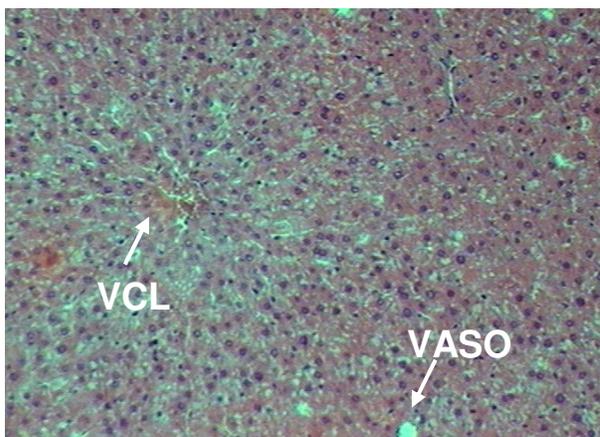
O estudo histológico foi realizado através da técnica de hematoxilina-eosina no fígado dos animais pertencentes aos quatro grupos avaliados. O tecido foi retirado no momento do sacrifício, e o aumento foi de 200x. Em todos os grupos o tecido hepático não apresentou evidências de esteatose ou de necrose celular, bem como presença de fibrose (perisinusoidal, centrilobular ou septal) ou processo inflamatório (granulócitos ou células mononucleares no espaço porta). Os núcleos celulares apresentam-se normais, com grupos de hepatócitos bem distribuídos. As diferenças entre as lâminas são artefatos que ocorreram durante o corte e a preparação do material. **Figuras 18, 19, 20 e 21.**



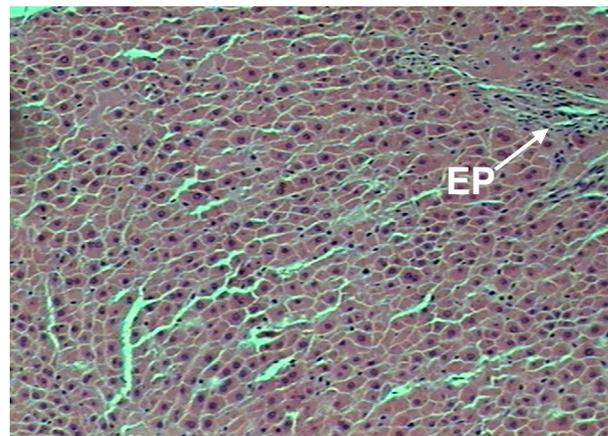
**Figura 18** – Fotomicrografia do grupo controle. EP-espaço porta



**Figura 19** – Fotomicrografia do grupo controle+quercetina.



**Figura 20** - Fotomicrografia do grupo diabético. VCL- veia centro lobular.



**Figura 21** - Fotomicrografia do grupo diabético+quercetina. EP- espaço porta.

## **5 - DISCUSSÃO**

---

## 5 - DISCUSSÃO

---

O fígado possui um papel central na manutenção da euglicemia. A glicemia depende da ingestão de carboidratos, da gliconeogênese e da glicogenólise. Em condições normais, é o principal órgão responsável pela gliconeogênese, na eventualidade de não haver necessidade de aumentar a glicemia, o tecido hepático e o muscular esquelético captam a glicose e a armazenam como glicogênio e gordura (JOHSON, 1991).

A prevalência de DM entre pacientes portadores de hepatopatias é muito diversa e parece estar relacionada com a sua causa. Nos pacientes cirróticos, com vírus C é de 29%, no vírus B, é de 6% e na doença colestática, é de 4%. (BIGAM, et. al., 2000). Há relatos de pacientes cirróticos terminais em que mais de 10% eram diabéticos, sendo que a prevalência por vírus C foi de 25%, 19% para o álcool e 1,3% nos colestáticos (ZEIN, et. al., 2000).

Os pacientes com DM apresentam expectativa de vida reduzida, situação que está relacionada aos efeitos metabólicos da doença e às complicações micro e macrovasculares decorrentes do longo tempo de duração da doença. As complicações metabólicas são as causas mais freqüentes de morte isolada nos pacientes diabéticos com idade inferior a 30 anos, e acima desta, as grandes responsáveis são as causas cardiovasculares (LAING, et. al., 1999).

Recentes estudos epidemiológicos têm referido o DM com uma das causas das doenças relacionadas com a infecção por vírus C (MEHTA, et. al., 2000), e como é uma doença multissistêmica que possui um defeito na secreção de insulina (DM tipo I), e/ou apresenta alteração na resistência à ação da insulina (DM tipo II), o fator que mais pode contribuir para tais complicações é a hiperglicemia. Entretanto, o exato mecanismo fisiopatológico desses fatores ainda permanece incerto, mas sugere-se que a via responsável pela alteração é a insuficiência que existe nas células que produzem a insulina (células beta pancreáticas).

O modelo experimental do DM vem sendo largamente utilizado e tem contribuído para melhorar o entendimento do quadro fisiopatológico apresentado em humanos. Diversos agentes químicos são utilizados para desenvolver o DM em animais, dentre os quais se destacam o aloxano e a estreptozotocina (STZ) (PICKUP & WILLIAMS, 1997). A indução do DM por simples injeção intravenosa ou intraperitoneal de estreptozotocina é provavelmente o meio mais utilizado nos modelos experimentais. Quando aplicada em doses de 50 a 60 mg/Kg, os níveis de insulina diminuem em 30% do normal, levando à hiperglicemia, poliúria, polidipsia e perda de peso. Entretanto, a severa cetose que ocorre em humanos parece não acontecer nos animais, determinando, assim, uma sobrevivência por várias semanas sem a reposição da insulina (PICKUP & WILLIAMS, 1997).

Estudos histoquímicos sugerem que deva existir algum mecanismo de apoptose celular, pois as células beta pancreáticas são destruídas após a administração da STZ. Isso se deve à diminuição na concentração da proteína tioredoxina (TRX), responsável pela neutralização dos radicais livres, ocorrendo, assim, a superprodução das EAO que podem determinar a morte das células pancreáticas (HOOTA, et. al., 2000).

A partir da indução do DM, uma quantidade de variáveis pode ser avaliadas no modelo experimental. Dall'Ago e colaboradores (1997) observaram alterações na frequência cardíaca e na pressão arterial, bem como na sensibilidade dos baro e quimiorreceptores quando comparados animais diabéticos com animais-controle. Ainda sobre o modelo de indução e estudo do DM induzido por estreptozotocina, Coskun, e colaboradores (2005) mostraram que a quercetina previne e protege as células beta pancreáticas contra o estresse oxidativo causado pela administração da droga. O estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito protetor da quercetina administrada intraperitonealmente na dose de 15 mg/Kg de peso corporal três dias antes da indução do DM, permanecendo a administração até o final do estudo (4<sup>a</sup> semana). As células pancreáticas também foram analisadas por imunohistoquímica, e os animais diabéticos aumentaram o estresse oxidativo quando comparados com o grupo controle, e naqueles que receberam a quercetina, houve diminuição do estresse oxidativo e a preservação das células pancreáticas.

A dose de quercetina utilizada em nosso estudo foi de 50mg/Kg de peso corporal e segundo Silva e colaboradores (2002) não existe efeito tóxico da droga nesta dose, pois em seu estudo foram utilizadas doses de 2.500, 1.250 e 625 mg/Kg de peso corporal de quercetina e verificado o efeito através das técnicas de ensaio por micronúcleos e cometa. Não houve mortalidade entre os animais avaliados, nem sinais clínicos de toxicidade, tampouco alteração no ensaio cometa e na técnica dos micronúcleos (SILVA, et. al., 2002). Isto nos leva a crer que existe segurança na dose utilizada em nosso estudo, e que esta não causará danos aos animais diabéticos, nem aos controles que receberam a quercetina.

A hiperglicemia é um fator de risco conhecido na patogênese do DM, podendo levar a diversas complicações, mas o exato mecanismo dos efeitos que o excesso de glicose determina nos tecidos permanece desconhecido. Diversos estudos demonstram que a hipótese mais provável é a de que o acúmulo de glicose sangüínea pode levar ao estresse oxidativo e isso seria o grande responsável pelas complicações tardias do DM (PACKER, et. al., 2000).

Em nosso estudo, aparentemente a administração da quercetina diminuiu os níveis da glicose sangüínea, mas não houve resultado significativo quando comparado o grupo diabético com o diabético que recebeu a quercetina (**Tabela 2**). Isso coincide com os resultados que reportam os benefícios do antioxidante ácido  $\alpha$ -lipóico (OBRASOVA, et. al., 1998; MARITIM, et. al., 2003), mas difere dos encontrados por Mahesh e Menom (2004), nos quais houve efeito hipoglicêmico em animais diabéticos após a administração da quercetina pelo período de duas semanas. Resultados semelhantes foram reportados por Vessal e colaboradores (2003), para os quais o nível glicêmico dos animais diabéticos retornou aos valores do grupo controle após a administração de quercetina na dose de 15 mg/Kg de peso corporal.

O efeito antidiabético da quercetina tem sido muito estudado atualmente, pois é cada vez maior o número de trabalhos científicos publicados relacionando a ingesta de flavonóides e os efeitos em diversas doenças. Shetty e colaboradores (2004) verificaram que a ingesta de 1 g/Kg de peso corporal de quercetina pelo período de 6 semanas em animais diabéticos causa diminuição da massa corpórea inferior à dos

diabéticos que não receberam a droga, sendo que o *status* dos animais diabéticos que receberam a quercetina melhorou em torno de 25%.

Em nosso estudo, o peso corporal diminuiu significativamente quando comparado o grupo diabético com o controle no final da oitava semana, enquanto os animais diabéticos que receberam a quercetina apresentaram pequena elevação, mas que não chegou a retornar aos valores iniciais (**Tabela 2**). Isso pode ocorrer em animais que permanecem por período muito prolongado em jejum, pois o glicogênio hepático está diminuído, e o glicerol é convertido à glicose. Como esse mecanismo é muito limitado, o substrato para a formação da glicose sanguínea são as proteínas, justificando assim a diferença encontrada em nosso trabalho.

Estudos suportam a idéia de que há aumento na formação da uréia, quando instalado o DM, bem como diminui a incorporação do aminoácido leucina no plasma e no fígado desses animais. O grau de incorporação pode estar reduzido em torno de 50% quando comparado com animais sem a doença (GITLIN, 1997). No estudo realizado por McNurlan & Garlick (1981), confirmou-se a hipótese de que a síntese das proteínas pode estar diminuída, em aproximadamente, 50% nos animais diabéticos, além de constatar diminuição nos níveis da síntese protéica por unidade de RNA. A provável causa da diminuição na síntese proteica pode estar relacionada com o retículo endoplasmático. Esses achados foram confirmados por diversos estudos, dentro os quais um deles demonstra aumento na degradação do retículo endoplasmático, o que determinaria uma elevação na autofagia da organela. Entretanto essa alteração não se faz presente nos animais com DM tratados com insulina (GITLIN, 1997).

A alteração oxidativa é um importante fenômeno biológico que pode ocorrer pela formação de um não-radical, como o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso ou pelo oxigênio *singlet*, mas também pelas espécies ativas de oxigênio (EAO), como o ânion superóxido e o radical hidroxil (OH<sup>•</sup>). Essas moléculas alteram as estruturas da membrana celular, mais precisamente os ácidos graxos polinsaturados da membrana, resultando na formação dos peróxidos lipídicos. As membranas das células e das organelas são mais suscetíveis à lipoperoxidação (LPO), pois contêm grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados. A reação de oxidação pode ser iniciada pelo radical hidroxil, pois é o mais reativo dos radicais (SOUTHORN & POWIS, 1988).

Ao iniciar a lipoperoxidação, o radical livre remove um átomo de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado, e como o átomo de hidrogênio possui somente um elétron, resta um elétron desemparelhado no átomo de carbono.

Assim, o processo de lipoperoxidação envolve a formação e a propagação de radicais lipídicos, e determina um rearranjo das duplas ligações nos lipídios instaurados. A eventual destruição dos lipídios da membrana faz surgir uma variedade de produtos da degradação, incluindo álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres (BUEGE & AUST, 1978), os quais podem ser medidos pelas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

No presente estudo, houve aumento nos níveis do TBARS hepático (**Figura 7**), o que, na verdade, é resultado da reação dos radicais livres com as estruturas da membrana celular. Isto tem sido proposto em trabalhos que avaliaram o tecido hepático de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (YLMAZ, et. al., 2004; CHO, et. al., 2002). As alterações encontradas nas substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico e na quimiluminescência (QL) confirmam estes achados e sugerem que o estresse oxidativo está presente no DM aos 60 dias de doença. Os resultados encontrados em nosso estudo são semelhantes a outros realizados em nosso laboratório, pois, ao avaliarmos a alteração hepática em animais com DM induzidos por STZ, encontramos aumento na lipoperoxidação nos animais diabéticos nos tempos 7, 30, 60 e 90 dias de doença, tanto para o TBARS, quanto para a QL (DIAS, et. al., 2004).

Após a administração da quercetina intraperitoneal, os animais diabéticos com 60 dias de doença apresentaram diminuição nos valores do TBARS e da QL (**Figuras 7 e 8**), o que concorda com os resultados apresentados por Mahesh e Menom (2004), pois também houve melhora no estresse oxidativo após a administração da quercetina.

Como o estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre a geração das espécies que reagem ao oxigênio e/ou nitrogênio e a capacidade de defesa corporal, tanto endógena quanto exógena, e sendo o sistema de defesa antioxidante enzimático um dos componentes deste complexo, serão discutidos a seguir os feitos da terapia antioxidante no DM. A quantidade e a atividade das enzimas antioxidantes podem estar alteradas na presença de algum processo fisiopatológico, caso do DM. Estudos

demonstram que a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) está diminuída em animais diabéticos. (WAHAIEB, et. al., 1987 e SEKEROGLU, et. al., 2000; OZKAYA, et. al., 2002). Entretanto, autores reportam aumento na atividade enzimática em animais diabéticos induzidos pela administração de estreptozotocina (YILMAZ, et. al., 2004; ALICIGUZEL, et. al., 2003 e HUANG, et. al., 1999). Essas contradições podem ocorrer devido à especificidade e à atividade do tecido avaliado, bem como à variação da severidade e o tempo de doença.(UGOCHUWKU, et. al., 2004).

A SOD dismuta o  $O^{\bullet-}_2$  e forma o  $H_2O_2$ , através de processos de oxidação e redução, e controla a concentração do estado estacionário do  $O^{\bullet-}_2$  (FRIDOVICH, 1976). Podemos observar na **figura 9** aumento significativo na atividade da enzima no grupo diabético quando comparado ao grupo controle (aumento de 30,4%), e, após a administração da quercetina, ocorreu uma diminuição além dos valores basais (118,8% em relação ao grupo diabético). Este aumento na atividade da SOD pode ser explicado porque em algumas doenças, ao invés de ocorrer diminuição, o aumento é decorrente da dismutação do  $O^{\bullet-}_2$ , que está aumentado quando do estresse oxidativo (MATKOVICS, 1977).

Como CAT é uma homoenzima que catalisa a dismutação do  $H_2O_2$  para formar  $O_2$  e  $H_2O$ , e está localizada fundamentalmente nos peroxissomos, ela remove o  $H_2O_2$  gerado nas reações da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos ou na oxidação dos alcanos, e pode estar alterada em algumas situações. Isto ocorreu em nosso trabalho, pois a atividade da CAT aumentou 115,5% nos animais diabéticos em relação ao grupo controle e praticamente voltou aos valores basais depois da administração da quercetina (em torno de 86,2% em relação ao grupo diabético) **Figura 10**. O aumento na atividade da CAT pode ser uma resposta compensatória ao aumento na produção do  $H_2O_2$  no fígado dos animais diabéticos, porque a deficiência da insulina promove a  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e resulta em maior formação de  $H_2O_2$  (HORIE, et. al., 1981).

O aumento da atividade da SOD e da CAT encontrado em nosso estudo pode ser uma resposta adaptativa ao aumento do estresse oxidativo no fígado dos animais diabéticos, onde, após a administração da quercetina, houve uma redução da

atividade. Nossos resultados concordam com aqueles previamente descritos por Maritim e colaboradores (2003) e Yilmaz e colaboradores (2004), cujos trabalhos avaliaram o efeito do ácido  $\alpha$ -lipóico e dos componentes do ácido cafeico fenetil ester [*caffeic acid phenethyl ester* (CAPE)], trazendo um benefício para o fígado dos animais diabéticos. Entretanto, difere do estudo realizado por Mahesh e Menom (2004), pois a atividade da SOD e da CAT estava reduzida nos eritrócitos de animais diabéticos e normalizou após 45 dias de administração da quercetina. O motivo que explicaria tal diferença é o tipo de tecido investigado, pois no primeiro foi estudo o tecido hepático e no segundo células sanguíneas.

Não encontramos diferença estatisticamente significativa na atividade da enzima glutaciona peroxidase (GPx) nos quatro grupos avaliados (**Figura 11**). Parece não haver interferência na atividade da GPx na decomposição do  $H_2O_2$ , que é produzido em maior quantidade após a instalação do DM (HALLIWEL & GUTTERIDGE, 1999). O que talvez esteja ocorrendo é que outras enzimas antioxidantes, como a CAT, estejam mais envolvidas na depuração das espécies ativas de oxigênio.

A GSH é um importante antioxidante endógeno produzido no fígado, cujos níveis podem estar alterados em diversas situações, pois participa de inúmeros processos enzimáticos intra e intercelulares, destacando a redução do  $H_2O_2$  até água e oxigênio. Pode ser oxidada durante a reação de redução do  $H_2O_2$  e formar a glutaciona oxidada (GSSG), através da ação da enzima GPx, podendo retornar à forma reduzida (GSH) pela ação de outra enzima, a glutaciona redutase (GRd). A redução da GSH e o aumento na relação GSSG/GSH são índices que demonstram que as EAO estão sendo geradas em quantidades acima dos valores basais. Em nosso estudo não encontramos diferença estatisticamente significativa na GSH, na GSSG, bem como na relação GSSG/GSH (**Figuras 12, 13 e 14**). Através desses resultados parece haver predominância de outras vias envolvidas na depuração das EAO, pois também não houve diferença na atividade da GPx em nenhum grupo estudado.

Em diversos tecidos a hiperglicemia e a formação dos ácidos graxos livres (situações existentes no DM) causam geração elevada nas espécies ativas de oxigênio, o que contribui para o aumento no estresse oxidativo. Os mecanismos moleculares decorrentes do estresse oxidativo podem contribuir para o

desenvolvimento de complicações decorrentes do estado fisiopatológico. Na ausência de respostas compensatórias apropriadas do sistema antioxidante, como o equilíbrio existente no estado redox celular, há ativação das vias de sinalização sensíveis ao estresse oxidativo, como o complexo composto pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), entre outros. Em células endoteliais bovinas tem sido demonstrado que a hiperglicemia inicialmente aumenta a produção intracelular das EAO e ativa o NF- $\kappa$ B, com subsequente aumento nos níveis do sorbitol (HOFMANN, et. al., 1999).

Elevados níveis de glicose sangüínea causam alterações vasculares e contribuem para o desenvolvimento de diversas complicações decorrentes do DM. Foi encontrado no estudo realizado por Hamuro e colaboradores (2002) que a hiperglicemia induziu a ativação do NF- $\kappa$ B, e que este seria o responsável também pela regulação do Óxido Nítrico (NO) local. O mesmo autor sugere que a inibição da atividade do NF- $\kappa$ B poderia ser um dos tratamentos para a aterosclerose presente no DM avançado.

A redução univalente da molécula de oxigênio é a maneira característica de gerar as EAO. O risco de formar as EAO é que elas podem contribuir para a formação de outros radicais livres. Assim, como existem as EAO, o metabolismo do NO gera as espécies ativas de nitrogênio (EAN), através das formas NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e ONOOH. A reação do ânion superóxido com o NO, produz o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), que é uma das ligações entre as EAO e as EAN (BOVERIS et al., 1998).

Banerjee e colaboradores (2002) investigaram os efeitos dos flavonóides sobre a atividade e a expressão da iNOS. Eles verificaram que células estimuladas por citocinas aumentaram a produção de NO, e, quando pré-tratadas com quercetina reduziam os valores de NO em relação aos animais controle. Sobre a expressão da iNOS, a quercetina teve potente ação inibitória, porém não apresentou a mesma ação sobre a expressão da mRNA da iNOS. O estudo realizado por Morigi e colaboradores (1998) demonstrou que a hiperglicemia contribuiu para o aumento da adesão leucocitária com o endotélio vascular nas veias umbilicais. O responsável pela maior produção nas proteínas envolvidas na adesão celular é possivelmente dependente da ativação do NF- $\kappa$ B. Também tem sido postulado que o ácido  $\alpha$ -lipóico bloqueia a ativação do NF- $\kappa$ B em pacientes com DM tipo II (HOFMANN, et. al., 1999), e que o  $\alpha$ -

fenil-tert-butilnitrona, agente que aprisiona elétrons livres que reagem com as espécies ativas de oxigênio, reduz significativamente a severidade da hiperglicemia em animais com DM induzido por STZ ou aloxano (HO, et. al., 2000).

Fato semelhante ocorreu no estudo realizado por Kowluru e colaboradores (2003), no qual a ativação do NF- $\kappa$ B e a elevação do estresse oxidativo estava reduzido em animais que receberam uma dieta contendo diversos antioxidantes pelo período superior a 14 meses. Os resultados desses estudos indicam que a ativação do NF- $\kappa$ B é o evento sinalizador inicial que contribui com a disfunção e/ou destruição celular. (BROWNLEE, 2001).

Em nosso estudo, ao avaliarmos o tecido hepático dos animais diabéticos encontramos aumento significativo na ativação do NF- $\kappa$ B em relação ao grupo controle (**Figura 15**). Como o estresse oxidativo também aumentou no grupo diabético (**Figuras 7 e 8**), juntamente com a glicose sangüínea (**Tabela 2**), acreditamos que deva existir uma relação entre as variáveis avaliadas em nosso estudo e o estresse oxidativo, pois, após a administração da quercetina, o estresse oxidativo e a ativação do NF- $\kappa$ B reduziram (**Figuras 7, 8 e 15**). Esses resultados suportam a hipótese de que o estresse oxidativo presente no DM ativa o NF- $\kappa$ B, e que após a administração da quercetina em animais diabéticos os valores retornam aos níveis dos animais sem a doença.

Em recente trabalho publicado por Moreira e colaboradores (2004), realizado em nosso laboratório, a administração da quercetina, intraperitonealmente, na dose de 50 mg/Kg de peso corporal (mesma dose utilizada em nosso estudo) preveniu o estresse oxidativo e a ativação do NF- $\kappa$ B na mucosa gástrica de ratos com hipertensão portal. Em relação a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) houve aumento significativo nos animais com hipertensão portal, os quais, ao receberem a quercetina, os valores diminuiram. Este estudo mostrou resultados semelhantes aos encontrados em nosso trabalho, apesar do modelo experimental utilizado ser diferente.

Sob circunstâncias fisiológicas, o NF- $\kappa$ B forma um complexo com seus inibidores, os I $\kappa$ Bs ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ), e são mantidos no citosol no estado inativo. O NF- $\kappa$ B pode “escapar” do controle de seus inibidores devido à ação direta das proteínas kinases, denominada de kinases do I $\kappa$ B ou complexo IKK. Esse complexo consiste em subunidades catalíticas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , e a subunidade reguladora IKK- $\gamma$  (ZANDI, et. al.,

1997). A ativação do complexo IKK conduz a fosforilação dos I $\kappa$ Bs, assim determinando a poliubiquinação e a degradação do proteossoma S26. A partir do momento em que está sem o seu inibidor, o NF- $\kappa$ B entra no núcleo celular e estimula a formação de genes específicos que participam de inúmeras respostas em diferentes doenças (STAAL, et. al., 1990; ROMICS, et. al., 2004). Alguns flavonóides inibem o NF- $\kappa$ B a partir da ativação do IKK (XIE & NATHAN, 1994), sendo que a quercetina inibe especificamente *in vitro* o IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$  (PEET & LI, 1999).

Em nosso estudo, os animais diabéticos aumentaram os níveis citoplasmáticos de IKK- $\alpha$  e diminuíram o I $\kappa$ B- $\alpha$ , e, após a administração da quercetina, os valores praticamente retornaram aos valores do grupo controle (**Figuras 16-1 e 16-3**). Em relação aos níveis de IKK- $\beta$  e I $\kappa$ B- $\beta$ , não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos, mesmo após a administração da quercetina (**Figuras 16-2 e 16-4**).

Os efeitos decorrentes da cascata do complexo IKK/I $\kappa$ Bs a partir da administração da quercetina, contribuem para a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B. A principal conseqüência da ativação das vias de sinalização intracelular são os produtos decorrentes do gene estimulado, tais como o NO, que podem causar diversos danos celulares e são os principais responsáveis pelas complicações apresentadas no DM.

A produção do NO pode contribuir com a hiperfiltração renal e com a microalbuminúria, sintomas apresentados na nefropatia diabética adiantada. (PRABHAKAR, 2004). Tem sido relatado previamente que existe uma elevação da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no fígado de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (MADAR, et. al., 2004). Nessa situação, o NO pode reagir com as espécies ativas de oxigênio/nitrogênio, formando o peroxinitrito, que é uma espécie oxidante altamente reativa, contribuindo com o estresse oxidativo ou nitrosativo (LLORENS & NAVA, 2003).

No presente estudo, houve uma supressão da ativação do NF- $\kappa$ B após a administração da quercetina, fato que impediu a degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$ , e que foi acompanhada pela *downregulation* da expressão da iNOS (**Figura 16-3 e 17**). Esses resultados confirmam os achados encontrados em outros modelos experimentais, tais como cultivos de macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) (CHO, et. al., 2003; MU, et. al., 2001). Resultados semelhantes foram encontrados por Kowluru e

colaboradores (2003) quando avaliaram os níveis do NO e da nitrotirosina na retina de animais diabéticos, pois houve inibição da ativação do NF- $\kappa$ B após a administração de múltiplos antioxidantes (KOWLURU, et. al., 2003).

Os resultados apresentados em nosso estudo demonstram que a administração da quercetina intraperitoneal inibe o estresse oxidativo, a ativação do NF- $\kappa$ B e a superexpressão da iNOS em animais diabéticos induzidos pela administração de STZ. O tratamento com a quercetina diminuiu as vias de transdução celulares do complexo IKK/IkBs, pois inibe a produção dos mediadores envolvidos no desenvolvimento da alteração hepática encontrado no DM avançado. Embora ocorra inibição causada pela quercetina e por outros antioxidantes endógenos específicos (enzimas antioxidantes), que são ativados em decorrência do estresse oxidativo, aparentemente a glicose sangüínea não é principal responsável pela melhora no tecido hepático, pois continua com valores acima do fisiológico.

As anormalidades hepáticas que acompanham as alterações existentes no DM têm sido motivo de grande curiosidade e estudo nos últimos anos. A obesidade e as complicações metabólicas parecem ser as principais responsáveis.

Em estudo clínico realizado com 13 pacientes que apresentavam DM foi possível demonstrar a deposição de colágeno e fibrose pericelular presente nas células hepáticas. Nesse estudo utilizou-se a microscopia eletrônica como método de avaliação, e, quando a alteração mostrava-se presente, era denominada de "destruição das células hepáticas" (HALL, 1995).

Diversas alterações hepáticas podem estar associadas ao DM tipo II, como a esteatose, a esteatohepatite não alcoólica e a cirrose. A microangiopatia sinusoidal parece ser o principal mecanismo fisiopatológico existente. A alta prevalência de esteatohepatite e cirrose em pacientes com DM sugere que seus portadores possuem um risco aumentado para desenvolver doença hepática (HALL, 1995).

Não encontramos diferença na avaliação histológica hepática nos grupos avaliados em nosso estudo (**Figuras 18, 19, 20 e 21**), fato que de certa forma discorda dos achados presentes na literatura. Acreditamos que o tempo de 60 dias ainda não foi suficiente para causar algum grau de alteração hepática, e, apesar de não haver alterações celulares visíveis, encontramos diferença entre os animais do grupo controle

e diabéticos, bem como após a administração da quercetina nos fatores de transcrição nuclear e na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT.

A quercetina como um flavonol, (ou flavonóide), é molécula pertencente ao grupo de compostos fitoquímicos que apresenta potenciais benefícios para a saúde humana, sendo também constituinte da dieta de origem vegetal(frutas e verduras) e da dieta humana, através dos alimentos e do vinho.

Tendo em vista nossos resultados, e considerando que a quercetina, quando administrada intraperitonealmente em animais diabéticos, inibe a ativação dos genes que estão sob o controle do NF- $\kappa$ B, diminui as substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a quimiluminescência (QL) hepática, re-estabelece a atividade das enzimas antioxidantes e inibe a formação da iNOS, seria de grande valia a realização de estudos futuros para identificar novos antioxidantes, bem como o exato mecanismo de ação molecular.

## **6 - CONCLUSÕES**

---

## 6 – CONCLUSÕES

---

---

- 1) O peso corporal dos animais diabéticos foi menor do que o controle após 60 dias de doença, e a quercetina não reverteu esta alteração.
- 2) A glicemia não diminuiu nos animais diabéticos, mesmo após a administração da quercetina.
- 4) Houve melhora na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no fígado de animais diabéticos após o uso da quercetina, mas não ocorreu mudança na atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx), bem como nos níveis citoplasmáticos da glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), e na relação GSSG/GSH.
- 5) O fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) nos animais diabéticos aumentou e foi atenuado naqueles que receberam a quercetina.
- 6) Os níveis citoplasmáticos hepáticos do IKK- $\alpha$  e do I $\kappa$ B- $\alpha$  melhoraram depois da administração do antioxidante, mas o IKK- $\beta$  e o I $\kappa$ B- $\beta$  não apresentou mudança.
- 7) A quercetina diminuiu a expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) hepática nos animais diabéticos.
- 8) Não existe alteração histológica no fígado de animais diabéticos após 60 dias de doença, e, a quercetina não interfere qualitativamente no quadro histopatológico.

Tendo em vista nossos resultados sugerimos que a quercetina protege o fígado do estresse oxidativo em ratos diabéticos.

## **7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 7 -REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. AEBI, H. Catalase in vitro. **Method Enzymol.** v.105; p.121-126, 1984.
2. ALICIGUZEL, Y.; OZEN, I.; ASLAN, M.; KARAYALCIN, U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. **J Lab Clin Med**, v. 142, p. 172-177, 2003.
3. ANJANEYULU, M. ; CHOPRA, K. Quercetin, na anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Clin Exper Pharmacol Physiol**, v. 31, p. 244-248, 2004.
4. ARNALICH, F.; HERNANZ, A.; LÓPEZ-MADERUELO, D.; FUENTE, M. D.; ARNALICH, F. M.; ANDRÉS-MATEOS, E.; FERNANDEZ-CAPITÁN, C.; MONTIEL, C. Intracellular glutathione deficiency is associated with enhanced nuclear factor- $\kappa$ B activation in older non-insulin dependent diabetic patients. **Free Rad Res**, v. 35, p. 873-884, 2001.
5. BABIOR, B. M. The enzymatic basis for  $O_2^{\bullet-}$  production by human neutrophils. **Can J Physiol Pharmacol**, v.60, p. 1353-1358, 1982.
6. BAKER, A.; PAYNE, C. M.; BRIEHL, M. M. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Res**, v.15, p.5162-5167, 1997.
7. BANERJEE, T.; VAN DER VLIET, A.; ZIBOH, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. **Prostag, Leukotr and Ess**, v. 66, n. 5, p. 485-492, 2002.
8. BATES, T. E.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G.; CLARK, J. B. Immunochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 213, p. 896, 1995.
9. BAUMGARTNER-PARZER, S. M.; WAGNER, L.; PETTERMANN, M.; GESSEL, A. WALDHUAUST, W. Modulation by high glucose of adhesion

- molecule expression in cultured endothelial cells. **Diabetologia**, v. 38, n.11, p. 1367-1370, 1995.
10. BAYNES, W. Chemical modification of protein by lipids in diabetes. **Clin Chem Lab Med**, v. 41, p. 1159-1165, 2003.
  11. BELLÓ-KLEIN, A. **Ação da vitamina A e do trolox sobre o stress oxidativo produzido pelo peróxido de hidrogênio no miocárdio isolado de rato**. Porto Alegre, 1993. 200 p. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
  12. BIGAM, D. L.; PENNINGTON, J. J.; CARPEMTIER, A.; WANLESS, I. R.; HEMMING, A. W.; CROXFORD, R.; GREIG, P. D.; LILLY, L. B.; HATHCOTE, J.; LEVY, G. A.; CATRAL, M. S. Hepatitis C – Related cirrhosis: a predictor of diabetes after liver transplantation. **Gut**, v.44, n.4, p. 575-578, 1999.
  13. BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 58, p. 350-356, 1998.
  14. BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem J**, v. 134, p. 707-716, 1973.
  15. BRINGOLD, U.; GHAFOURIFAR, P.; RITCHER, C. Peroxynitrite formed by mitochondrial NO synthase promotes mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release. **Free Radic Biol Med**, v. 29, p. 343, 2000.
  16. BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, p. 813–820, 2001.
  17. BUEGE, J. A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Method Enzymol**, v. 52; p. 302-309, 1978.
  18. CAO, G.; SOFIC, E.; PRYOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Rad Biol Med**, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997.
  19. CEDERBERG, J.; SIMÁN MARTIN, C.; ERIKSSON, U. J. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decrease oxidative stress and

- improve fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. **Pediatr Res**, v. 49, p. 755-762, 2001.
20. CERIELLO, A.; MERCURI, F.; QUAGLIARO, L. et. al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. **Diabetologia**, v. 44, p. 834-838, 2001.
21. CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Reviews**, v. 59, p. 527-605, 1979.
22. CHO, S. Y. ; PARK, J.Y. ; PARK, E. M. ; CHOI, M. S.; LEE, M. K. ; JEON, S. M. ; JANG, M. K. ; KIM, M. J. ; PARK, Y. B. Alteration of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. **Clin Chim Acta**, v. 17, p. 109-117, 2002.
23. CHO, S.Y.; PARK, S.J.; KWON, M.J.; JEONG, T.S.; BOK, S.H.; CHOI, W.Y.; JEONG, W.I.; RYU, S.Y.; DO, S.H.; LEE, C.S.; SONG, J.C.; JEONG, K.S. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF-kappaB pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. **Mol Cell Biochem**, v. 243, p. 153-160, 2003.
24. CINGOLANI, H. E.; HOUSSAY, A. B. **Fisiologia humana de Houssay**. 7<sup>a</sup> Edição, Editora Artmed, Porto Alegre, 2004.
25. CLOSA, D.; FOLCH-PUY, E. Oxygen free radicals and the systemic inflammatory response. **Life**, v. 56, n.4, p. 185-191, 2004.
26. COLLINS, T.; CYBULSKY, M. I. NF- $\kappa$ B pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? **J Clin Invest**, v. 107, n. 3, p. 255-264, 2001.
27. COOPEY, L. J.; GELLET, J. J.; DAVIDSON, E. P.; DUNLAP, J. A.; LUND, D. D.; YOREK, M. A.; Effect of antioxidant treatment of streptozotocin-induced diabetics rats on endoneurial blood flow, motor nerve, conduction velocity, and vascular reactivity of endoneurial arterioles of the sciatic nerve. **Diabetes**, v. 50, p. 1927-1937, 2001.
28. COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced

- oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. **Pharmacol Res**, v. 51, p. 117-123, 2005.
29. CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J Immunol Meth**, v. 265, p. 49-72, 2002.
30. DALL'AGO, P.; FERNANDES, T. G.; MACHADO, U. F.; BELLÓ, A. A.; IRIGOYEN, M. C. Baroreflex and chemoreflex dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. **Braz J Biol Res**, v. 30, n.1, p. 119-124, 1997.
31. DAY, A. J.; BAO, Y.; MORGAN, M. R. A.; WILLIANSON, G. Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. **Free Rad Biol Med**, v. 29, n. 12, p. 1234-1243, 2000.
32. DEL MAESTRO, R. F. An approach to free radicals in medicine and biology. **Acta Physiol Scan Suppl**, v.492, p.153-167, 1980.
33. DELAMAIRE, M. ; MAUGENDRE, D. ; MORENO, M. ; LE GOFF, M. C. ; ALLANIC, H. ; GENETET, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. **Diabet Med**, v. 14, p. 29-34, 1997.
34. DIAS, A. S. ; LLESUY, S. ; MARRONI, C. A. ; MARRONI, N. Alterações gastrointestinais no diabetes mellitus : estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica- estudo experimental. **Arq Gastroenterol**, v. 41, p. 108-113, 2004.
35. ESSANI, N.A.; MCGUIRE, G.M.; MANNING, A.M.; JAESCHKE, H. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells *in vivo*. **J Immunol**, v.156, p. 2956, 1996.
36. FERNANDES, A. A. H., SILVA, M. S.; BATISTELLA, R. F.; NASCIMENTO, S. M.; BORDON, J. G.; NOVELLI, E. L. B. Efeitos da quercetina sobre os parâmetros bioquímicos séricos e teciduais no diabetes mellitus tipo 1. **Diab Clín**, v. 1, p. 48-52, 2004.

37. FRIDOVICH, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxide, and oxygen toxicity. In: PRYOR, W. A. **Free radicals in biology**. New York: Academic Press, p. 239-277, 1976.
38. GALBO, H. Exercise and diabetes. **Scand J Sports Sci**, v. 10, n. 2-3, p. 89-95, 1988.
39. GALLACHER, S. J. ; THOMSON, G.; FRASER, W. D.; FISHER, B. M.; GEMMELL, C. G.; MACCUISH, A.C. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus evidence for association with blood glucose control. **Diabet Med**, v. 12, p. 916-920, 1995.
40. GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA, G.; TEW, K.D.; TAPIERO, H. Oxidative stress induced of pathologies: the role of antioxidants. **Biomed & Pharmacother**, v.53, p.169-180, 1999.
41. GITLIN, N. **The Liver and systemic disease**. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1997.
42. GOLDIM, J.R.; RAYMUNDO, M.M. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. 2ª Ed. Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, 1997.
43. GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hidroperoxide initiated chemi-luminescence: an assay oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. **Free Rad Biol Med**, v.10; p. 93-100, 1991.
44. GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. I. Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.
45. GROSS, S.S.; WOLIN, M. S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, v.57, p.737-69, 1995.
46. GUNTZLER, W. A.; FLOHE, L. Glutathione peroxidase. In: **Handbook of Methods for Oxygen Radical Research**. Ed. R.A. Greenmald. CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 285-290, 1985.
47. HALL, P. **Alcoholic liver disease**. 2<sup>nd</sup> Edition, Ed. Edward Arnold. Boston, 1995.

48. HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. (2<sup>nd</sup> ed.), Oxford: Clarendon Press, 1989.
49. HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3<sup>rd</sup>, Oxford University Press, 1999.
50. HAMURO, M.; POLAN, J.; NATARAJAN, M.; MOHAN, S. High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration. **Atherosclerosis**, v. 162, p. 277-287, 2002.
51. HARRIS, M. ; CAHILL, G. Members of NIH diabetes data group workshop: a draft classification of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. **Diabetes**, v.27, p. 1112-1125, 1978.
52. HATTORI, Y.; HATTORI, S.; SATO, N.; KAÇAI, K. High-glycose-induced nuclear factor kappa  $\beta$  activation in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res**, v. 46, n. 1, p. 188-197, 2000.
53. HERTOOG, M. G.; HOLLMAN, P. C.H.; KATAN, M. B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands. **Nutr Cancer**, v. 20, p. 21-29, 1993.
54. HISSIN, P. J. & HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analyt Biochem**, v. 74, p. 214-226, 1976.
55. HO, E.; CHEN, G.; BRAY, T.M. A-Phenyl-tert-butylNitroen (PBN) inhibits NF- $\kappa$ B activation offering protection against chemically induced diabetes. **Free Rad Biol Med**, v. 28, p. 604-614, 2000.
56. HOFMANN, M. A.; SCHIEKOFER, S.; KANITZ, M.; KLEVESATH, M. S.; LOSWIG, M.; LEE, V.; MORCOS, M.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; WAHL, P.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P. Insufficient glycemic control increases nuclear factor  $\kappa$ -B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 21, n. 8, p. 1310-1316, 1998.
57. HOFMANN, M.A.; SCHIEKOFER, S.; ISERMANN, B.; KANITZ, M.; HENKELS, M.; JOSWIG, M.; TREUSCH, A.; MORCOS, M.; WEISS, T.; BORCEA, V.; ABDEL KHALEK, A. K.; AMIRAL, J.; TRITSCHLER, H.; RITZ,

- E.; WAHL, P.; ZIEGLER, R.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.P. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative stress-sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B. **Diabetologia**, v. 42, p. 222-232, 1999.
58. HORIE, S.; ISHII, H.; SUGA, T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. **J Biochem**, v. 90, p. 1691–1696, 1981.
59. HOTTA, M.; YAMATO, E.; MIYAZAKI, J. Oxidative stress and pancreatic  $\beta$ -cell destruction in insulin dependent diabetes mellitus. p. 265-274, 2000 In: PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. **Antioxidants in diabetes management**. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000.
60. HOUNSOM, L.; TOMLISON, D. R. Does neuropathy develop in animal models? **Clin Neurosci**, v.4, p. 380-389, 1997.
61. HUANG, W.C.; JUANG, S.W. ; LIU, I.M. ; CHI, T.C. ; CHENG, J.T. Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin induced diabetic rats. **Neurosci Lett**, v. 275, p. 25-28, 1999.
62. HUIE, RE.; PADMAJA, S. The reaction of NO with superoxide. **Free Rad Res Commun**, v.18, p. 195-199, 1993.
63. HÜNKAR, T.; AKTAN, F.; CEYLAN, A.; KARASU, Ç. Antioxidants in diabetes-induced complications) THE ADIC STUDY GROUP. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. **Cell Biochem Funct**, v.20, p. 297-302, 2002.
64. JANG, Y. Y.; SONG, J. H. ; SHIN, Y. K.; HAW, E. S.; LEE, C. S. Protective effects of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetics rats. **Pharmacol Res**, v. 42, p. 361-371, 2000.
65. JOHNSON, P. J. The liver in diseases of other systems. The effect of endocrine diseases on liver function. In: McINTYRE, N. et. al. Ed. **Oxford Textbook of Clinical Hepatology**. New York Oxford University, cap. 24.6, p. 1196-1204, 1991.
66. KANNER, J. & HAREL, S. Initiation of membranal lipid peroxidation by activated metmyoglobin and methemoglobin. **Arch Biophys**, v. 273, n. 2, p. 314-321, 1985.

67. KARIN, M. The beginning of the end: Ikappa  $\beta$  kinase (IKK) and NF-kappa B activation. **J Biol Chem**, v. 274, p. 27339-27342, 1999.
68. KNEKT, P.; ISOTUPA, S.; RISSANEN, H.; JÄRVINEN, R.; HÄKKINEN, S.; AROMAA, A.; REUNANEN, A. Quercetin intake and the incidence of cerebrovascular disease. **Eur J Clin Nut**, v. 54, p. 415-417, 2000.
69. KOWLURU, R.A.; KOPPOLU, P.; CHAKRABARTI, S.; CHEN, S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. **Free Rad Res**, v. 37, p. 1169-1180, 2003.
70. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
71. LAING, S. P.; SWERDLOW, A. J.; SLATER, S. D.; BOTHA, J. L.; BURDEN, A. C.; WAUGH, N. R.; SMITH, A. W.; HILL, R. D.; BINGLEY, P. J.; PATTERSON, C. C.; QIAO, Z.; KEEN, H. The British Diabetic Association Cohort Study, II: cause-specific mortality in patients with insulin-treated diabetes mellitus. **Diab Med**, v. 16, n. 6, p.466-471, 1999.
72. LEAN, M. E. J.; NOROOZI, M.; KELLY, I.; BURNS, J.; TALWAR, D.; SATTAR, N.; CROZIER, A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. **Diabetes**, v. 48, p. 176-181, 1999.
73. LIKE, A. A.; ROSSINI, A. A. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: a new model of diabetes mellitus. **Science**, v. 193, p. 415-417, 1976.
74. LLESUY, S. F. Introducción y especies activas de oxígeno. in MARRONI, N., **Estresse oxidativo e antioxidantes**, Canoas, Ed. ULBRA, p. 21-31, 2002.
75. LLORENS, S.; NAVA, E. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 1, p. 335-346, 2003.
76. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the foline reagent. **J Biol Chem**, v. 193; p. 265-275, 1951.
77. MACHLIN, L. J. & BENDICH, A. Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB J**, v. 1, p. 441-445, 1987.

78. MADAR, Z.; KALET-LITMAN, S.; STARK, A.H. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. **Pharmacology**, v. 73, p. 106-112, 2004.
79. NAKANO, S.; HIMENO, M.; TSUDA, S.; MAKIISHI, H.; ITO, T.; NAKAGAWA, A.; KIGOSHI, T.; ISHIBASHI, T.; NISHIO, M.; UCHIDA, K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in type 2 diabetic subjects relationship to microvascular complications. **J Diabet Comp**, v. 15, p. 135-143, 2001.
80. MAHESH, T.; MENOM, V. P. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phytother Res**, v.18, p. 123-127, 2004.
81. MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69yr. **Diabetes Care**, v. 15, p.1509-1516, 1992.
82. MANACH, C.; TEXIER, O.; MORAND, C.; CRESPIY, V.; RÉGÉRAT, F.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. **Free Rad Biol Med**, v. 27, n. 11/12, p. 1259-1266, 1999.
83. MARITIM, A.C.; SANDERS, R.A.; WATKINS III, J.B. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetics rats. **J Nutr Biochem**, v.14, p. 288-294, 2003.
84. MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic medical biochemistry**. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.
85. MATHIAS, T. A. F.; JORGE, M. H. P. M. Diabetes Mellitus na população idosa em município da região sul do Brasil: um estudo da mortalidade e morbidade hospitalar. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 4, p. 505-512, 2004.
86. MATKOVICS, B. Effect of plant and animal lesions on superoxide dismutase activities. In: **Superoxide and superoxide dismutase**. McCORD, G.; MICHELSON, A. M.; FRIDOVICH, I. (Eds) Academic Press, New York. p. 501-515, 1977

87. MATTEONI, C. ; YOUNOSSI, Z. ; GRAMLICH, T. ; BOPARI, N. ; LIU, T. ; McCULLOUGH, A. Nonalcoholic fatty liver disease : a spectrum of clinical and pathological severity. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1413-1419, 1999.
88. McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzyme function for erythrocyte (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.
89. McNURLAN, M. A.; GARLICK, P. J. Protein synthesis in liver and small intestine in protein deprivation and diabetes. **Am J Physiol**. v. 241, p. E238-E245, 1981.
90. MEHTA, S. H. ; BRANCATI, F. L. ; SULKOWSKI, M. S. ; STRATHDEE, S. A. ; SZKLO, M. ; THOMAS D.L. Prevalence os type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. **Ann Intern Med**, v. 133, p. 592-599, 2000.
91. MEIGS, J. B.; HU, F. B.; RIFAI, N.; MANSON, J. E. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk os type 2 diabetes mellitus. **JAMA**, v. 291, n. 16, p. 1978-1986, 2004.
92. MENEGHINI, R. A toxicidade do oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, p. 57-62, 1987.
93. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005. Disponível em: <[http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=17194](http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=17194)>. Acesso em 21/05/2005.
94. MIRSA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, p. 3170-3175, 1972.
95. MOREIRA, A. J.; FRAGA, C.; ALONSO, M.; COLLADO, P. S.; ZETLLER, C.; MARRONI, C.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 1939-1946, 2004.
96. MORIGI, M.; ANGIOLETTI, S.; IMBERTI, B.; DONADELLI, R.; MICHELETTI, G.; FIGLIUZZI, M.; REMUZZI, A.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. Leukocyte-endothelial interaction is augmented by high concentrations and

- hyperglycemia in a NF- $\kappa$ B-dependent fashion. **Clin Invest**, v. 101, p. 1905-1915, 1998.
97. MU, M.M.; CHAKRAVORTTY, D.; SUGIYAMA, T.; KOIDE, N.; TAKAHASHI, K.; MORI, I.; YOSHIDA, T.; YOKOCHI, T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. **J Endotoxin Res**, v. 7, p. 431-438, 2001.
98. MURPHY, M. E.; SIES, H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. **Proc Natl Acad Sci**, v. 88, p.10860-10864, 1991.
99. NATHAN, DM.; MEIGS, J.; SINGER, DE. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is, or is it? **Lancet**, v. 350 (suppl. 1), p. S14-S19, 1997.
100. OBROSOVA, I.; CAO, X.; GREENE, D.A; STEVENS, M.J. Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid. **Diabetologia**, v. 41, p. 1442-1450,1998.
101. OZKAYA, Y.G.; AGAR, A.; YARGICOGLU, P.; HACIOGLU, G.; BILMENS-  
SAIKCIOGLU, S.; OZEN, I.; ALICIGUZEL, Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. **Diabetes Metab**, v. 28, p. 377-384, 2002.
102. PACKER, L.; FUCHS, J. *Vitamin E in health and disease*. New York: Marcell Dekker. Inc, 1993. PACKER, L.; RÖSEN, P.; TRITSCHLER, H. J.; KING, G. L.; AZZI, A. **Antioxidants in diabetes management**. Ed. Marcel Dekker, N. Y., 2000.
103. PAVANATO, M.A.; TUÑÓN, M.J.; SÁNCHEZ-CAMPOS, S.; MARRONI, C.; LLESUY, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; MARRONI, N.; Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. **Dig Dis Sci**, v. 48, n. 4, p. 824-829, 2003.
104. PAZA, T.B.C.; PEDROSA, R.C. Alvos moleculares na pesquisa de fitofármacos e fitoterápicos, In. YUNES, R.A. e CALIXTRO, J.B. **Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. p. 195-227, Chapecó, UNOESC, 2001.

105. PEET, G.W.; LI, J. IKappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporin and quercetin. **J Biol Chem**, v. 274, p. 2655-2661, 1999.
106. PERES, W.; TUÑÓN, M. S.; COLLADO, P. S.; HERRMANN, S.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. **J Hepatol**, v. 33; p. 742-750, 2000.
107. PICKUP, J. C.; WILLIAMS, C. **Textbook of diabetes**. 2<sup>nd</sup> Ed. Blacwell Science, 1997.
108. PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; WILLIANSON, G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. **Redox Report**, v. 4, p. 13-16, 1999.
109. PRABHAKAR, S.S. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. **Semin Nephrol**, v. 24, p. 333-344, 2004.
110. RADI, R.; CASSINA, A.; HODARA, R.; QUIJANO, C.; CASTRO, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. **Free Rad Biol Med**, v. 33, p. 1451-1460, 2002.
111. RANELLETTI, F. O.; RICCI, R.; LARACCA, L. M. Growth inhibitory effects of quercetin and presence of estrogen binding sites in human colon cancer cells lines and primary colorectal tumours. **Int J Cancer**, v. 50, p. 486-492, 1992.
112. REILLY, P.M.; SCHLLER, H. J.; BULKEY, G.B. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. **Am J Surg**, v. 161, p. 488-503, 1991.
113. RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. **Biochemical Society Transactions**, v. 24, 1996.
114. ROBBINS, M. J.; SHARP, A. R.; SLONIN, A. E.; BURR, I. M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. **Diabetologia**, v. 18, p. 55-80, 1980.
115. ROMICS, L.; KODYS, K.; DOLGANIUC, A.; GRAHAM, L.; VELAYUDHAM, A.; MANDREKAR, P.; SZABO, G. Diverse regulation of NF-κB and

- peroxisome proliferators-activated receptors in murine non-alcoholic fatty liver. **Hepatology**, v. 40, p. 376-385, 2004.
116. ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability metabolic effects, and safety. **Ann Rev Nutr**, v. 22, p. 19-34, 2002.
117. SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Rad Biol Med**, v. 19, n. 4, p. 481-486, 1995.
118. SAILAJA DEVI, M. M.; SURESH, Y.; DAS, U. N.; Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin. **J Pienal Res**, v. 29, p. 108-115, 2000..
119. SCHIMDT, A. M.; HORI, O.; CHEN, J. X.; et. al. Advanced glycosilation endproducts interacting with their endothelial receptors induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), in cultured human endothelial cells and in mice. **J Clin Invest**, v. 96, n. 3, p. 1395-1403, 1995.
120. SEKEROGLU, M.R.; SAHIN, H.; DULGER, H.; ALGUN, E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clin Biochem**, v. 33, p. 669-674, 2000.
121. SHETTY, A. K.; RASHMI, R.; RAJAN, M. G. R.; SAMBAIAH, K.; SALIMATH, P. V. Antidiabetic influence of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutr Res**, v. 24, p. 373-381, 2004.
122. SILVA, J.; HERRMANN, S. M.; HEUSER, V.; PERES, W.; MARRONI, N.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; ERDTMANN, B. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 941-947, 2002.
123. SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 2ª Edição, Ed. Manole, São Paulo, 2003.
124. SOUTHORN, P.A. & POWIS, G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. **Mayo Clin Proc**, v. 63, p.381-389, 1988.

125. SPITALER, M.M.; GRAIER, W.F. Vascular targets off redox signaling in diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 45, p. 476-494, 2002.
126. SQUADRITO, G. L.; PRYOR, W. A. The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. **Chem Biol Interact**, v. 96, p. 203-206, 1995.
127. STAAL, F.J.T.; ROEDERER, M.; HERZENBERG, L.A.; HERZENEBERG, L.A. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor $\kappa$ B and transcription of human immunodeficiency virus. **Proc Natl Acad Sci**, v. 87, p. 9943-9947, 1990.
128. STADLER, K.; JENEI, V.; VON BOLCSHAZY, G.; SOMOGYI, A.; JAKUS, J. Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats. **Orv Hetil**, v. 145, p. 1135-1140, 2004.
129. SZABO, C.; LIAUDET, L.; SORIANO, F.G. Biology of nitric oxide signaling. **Crit Care Med**, v. 28, n. 4, p. 37-52, 2000.
130. TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Induction of gastric lesions and hypoglycemic response by food deprivation in streptozotocin-diabetic rats. **Dig Dis Sci**, v. 39, n. 3, p. 626-634, 1994.
131. TARIK, A. E. ; KENNEDY, G. ; HILL, A.; McLAREN, M.; NEWTON, R. W.; GREENE, S. A.; BELCH, J.J. Abnormal markers of endothelial cell activation and oxidative stress in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes with no clinical vascular disease. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 15, p. 405-411, 1999.
132. TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, M. Los flavonóides como antioxidantes naturales. **Acta Farma Bonaerense**, v.20, n. 4, p. 63-69, 2001.
133. TZENG, S. H.; KO, W. C.; KO, F. N. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. **Thromb Res**, v. 64, p. 91-100, 1991.
134. UCHIGATA, Y.; YAMAMOTO, H.; NAGAI, H.; OKAMOTO, H. Effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibitor administration to rats before and after injection of alloxan and streptozotocin on islet proinsulin synthesis. **Diabetes**, v. 32, p.316-318, 1983.

135. UDA, Y.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON, G.; RHODES, M. J. C. Induction of the anticarcinogenic marker enzyme quinone reductase in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. **Cancer Lett**, v. 120, p. 213-216, 1997.
136. UGOCHUWKU, N.H.; BAGAYOKO, N.D.; ANTWI, M.E. The effects of dietary caloric restriction on antioxidant status and lipid peroxidation in mild and severe streptozotocin-induced diabetic rats. **Clin Chim Acta**, v. 34, p. 121-129, 2004.
137. VAN ACHER, S. A. B. E.; VAN DEN BERG, D.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Rad Biol Med**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.
138. VAN DAM, P. S. Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. **Diabetes Met Res Rev**, v. 18, p. 176-184, 2002.
139. VANNUCHI, H.; ARAÚJO, W. F.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JR, A. A. Effect of different vitamin E levels on lipid peroxidation in streptozotocin-diabetic rats. **Int J Vitam Nutr Res**, v. 69, n. 4, p. 250-254, 1999.
140. VESSAL, M. ; HEMMATI, M. ; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Compar Biochem Physiol**, v. 135-part C, p. 357-364, 2003.
141. VURAL, H.; SABUNCU, T.; ARSLAN, S. O.; ASKOY, N. Melatonin inhibits lipid peroxidation and stimulates the antioxidant status of diabetic rats. **J Pineal Res**, v. 31, p. 193-198, 2001.
142. WAHAIEB, S.A.; GODIN, D.V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. **Diabetes**, v. 36, p. 1014-1018, 1987.
143. WERNS, S. W. & LUCCHESI, B. R. Free radicals and ischemic tissue injury. **TIPS**, v. 11, p. 161-166, 1990.
144. WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? **Free Rad Biol Med**, v. 36, n. 7, p. 838-849, 2004.

145. WOLFF, S.P.; DEAN, R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. **Biochem J**, v. 245, p. 243–250, 1987.
146. WOLFF, S.P.; JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. **Free Radic Biol Med**, v.10, p. 339–352, 1991.
147. XIE, Q.; NATHAN, C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. **J Leukoc Biol**, v. 56, p. 576-682, 1994.
148. YAMAMOTO, H.; UCHIGATA, Y.; OKAMOTO, H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. **Nature**, v. 294, p.284-286, 1981.
149. YILMAZ, H.R.; UZ, E.; YUCEL, N.; ALTUNTAS, I.; OZCELIK, N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 18, p. 234-238, 2004.
150. YOSHIDA, M.; SAKAY, T.; HOSOKAWA, N. The effect of quercetin on cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEBS Lett**, v. 28, p. 10-13, 1990.
151. YUNES, R.A. e CALIXTRO, J.B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó, UNOESC, 2001.
152. ZANDI, E.; ROTHWARF, D.M.; DELHASE, M.; HAYAKAWA, M.; KARIN, M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. **Cell**, v. 91, p. 243-252, 1997.
153. ZEIN, N. N.; ABDULKARIM, A. S.; WIESNER, R. H.; EGAN, K. S.; PERSING, D. H. Prevalence of diabetes mellitus in patients with end-stage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. **J Hepatol**, v. 32, n. 2, p. 209-217, 2000.

## **8 – CARTA DE ACEITE**

---

O artigo referente a tese foi aceito para publicação no periódico internacional ***Journal of Nutrition***, classificado como ***Qualis A internacional***.

RE: NUTRITION/2005/049965

Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF-kappaB Activation and iNOS Overexpression  
in Liver of Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Alexandre Dias

Dear Dr. Alexandre Dias:

As a follow-up to previous correspondence you have received from Dr. Fernandez, I am pleased to inform you that the manuscript entitled "Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF-kappaB Activation and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-induced Diabetic Rats" has been accepted for publication. You will be sent a pdf page proof to download electronically in 3 to 4 weeks. Please proofread, correct, and return the proof within 48 hours of receipt, according to the instructions that will be provided. If the research reported in your manuscript was supported with NIH funding, please see the instructions below concerning the submission of accepted manuscript files to PubMed Central. Additional information on ASNS policy and the PubMed Central Repository is available at the following url: [www.nutrition.org/misc/ASNS\\_Policy.pdf](http://www.nutrition.org/misc/ASNS_Policy.pdf)

We look forward to the publication of your article, and thank you for submitting your manuscript to The Journal of Nutrition.

Sincerely yours,

A. Catharine Ross

Editor

The Journal of Nutrition

Professor of Nutritional Sciences

The Pennsylvania State University

## **9 – ARTIGO**

---

## Quercetin Decreases Oxidative Stress, NF- $\kappa$ B Activation, and iNOS Overexpression in Liver of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Alexandre Simões Dias,\* Marilene Porawski,<sup>†</sup> María Alonso,\*\* Norma Marroni,\*<sup>†</sup> Pilar S. Collado,\*\* and Javier González-Gallego\*\*<sup>1</sup>

\*Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil; <sup>†</sup>Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil; and \*\*Department of Physiology, University of León, 24071 León, Spain

**ABSTRACT** Increasing evidence in both experimental and clinical studies suggests that oxidative stress is involved in the pathogenesis and progression of diabetic tissue damage. This study investigated the protective effects of quercetin treatment on oxidative stress, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B activation and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in streptozotocin-induced diabetic rats. Male Wistar rats were divided into 4 groups: control rats, control rats treated daily with quercetin (150  $\mu$ mol/kg, i.p.), untreated diabetic rats, and diabetic rats treated with quercetin. Diabetes was induced by a single i.p. injection of streptozotocin (70 mg/kg). Eight weeks later we measured TBARS and hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL) in liver as markers of oxidative stress, and activities of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase, NF- $\kappa$ B activation by an electrophoretic mobility shift assay and expression of I $\kappa$ B kinases (IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ ), the inhibitor I $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$ ), and iNOS by Western blot. The plasma glucose concentration was significantly increased in diabetic rats and was not changed by quercetin. Streptozotocin administration induced significant increases in hepatic TBARS concentration, QL, and SOD and catalase activities that were prevented by quercetin. Activation of NF- $\kappa$ B, induction of IKK $\alpha$  and iNOS protein levels, and increased degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  were also observed in streptozotocin-treated rats. All of those effects were abolished by quercetin. These findings suggest that quercetin treatment, by abolishing the IKK/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway, may block the production of noxious mediators involved in the development of early diabetes tissue injury and in the evolution of late complications. J. Nutr. 135: 2299–2304, 2005.

**KEY WORDS:** • diabetes • quercetin • oxidative stress • nuclear factor- $\kappa$ B • nitric oxide

Diabetes mellitus is one of the most common endocrine metabolic disorders. In recent years, a large body of evidence suggested oxidative stress as a mechanism underlying insulin resistance, type I and type II diabetes, and diabetic complications (1). Hyperglycemia causes oxidative stress due to increased mitochondrial production of the superoxide anion (2), nonenzymatic glycation of proteins (3), and glucose autooxidation (4,5). FFA, which are elevated in diabetes and insulin resistance, may also contribute to the increased production of reactive oxygen species (ROS)<sup>2</sup> due to increased mitochondrial uncoupling and  $\beta$ -oxidation (6,7). In addition, hyperglycemia and FFA-induced oxidative stress lead to the activation of stress-sensitive signaling pathways, including nuclear factor (NF)- $\kappa$ B (8).

Hyperglycemia also favors, through the activation of NF- $\kappa$ B, an increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is accompanied by increased generation of nitric oxide (9). Nitric oxide can react with superoxide to

produce the strong oxidant peroxynitrite, which in turn can increase lipid peroxidation, protein nitration, and LDL oxidation, affecting many signal transduction pathways (10). Recent experimental evidence supports the idea of complex roles for nitric oxide, ROS, and peroxynitrite in the development of early diabetes tissue injury before the evolution of late complications (11).

The role of oxidative stress in insulin resistance and diabetes is clouded by the results of intervention studies with antioxidants, which are elusive or unsuccessful (12). Although studies of short duration appear to support an improved insulin sensitivity in insulin-resistant and diabetic patients (8) and a prevention of the progression of diabetic complications by vitamin C and vitamin E (13,14), long-duration clinical trials with classical antioxidants, in particular with vitamin E, did not demonstrate any maintained beneficial effect (12,15). However, although it may not be possible to completely reverse diabetic complications, antioxidants could be useful in preventing or attenuating the adverse effects of chronic hyperglycemia (7).

Flavonoids are phenolic phytochemicals; they are important constituents of the nonenergetic part of the human diet and are thought to promote optimal health, partly via their antioxidant effects in protecting cellular components against

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail: dfjgg@unileon.es.

<sup>2</sup> Abbreviations used: C, control; CQ, quercetin treatment; D, diabetes; DQ, diabetes + quercetin treatment; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; I $\kappa$ B, inhibitor of NF $\kappa$ B; IKK, I $\kappa$ B kinase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; NF, nuclear factor; QL, chemiluminescence; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase.

ROS (16). Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavon) is one of the most widely distributed flavonoids, present in fruit, vegetables, and many other dietary sources (17). This compound was reported to scavenge superoxide in ischemia-reperfusion injury (18), to protect against oxidative stress induced by UV light (19), spontaneous hypertension (20), secondary biliary cirrhosis (21), and bacterial lipopolysaccharide (22), and to inhibit angiogenesis (23), carcinogenesis, (24) and portal hypertensive gastropathy (25). At doses of 50 and 80 mg/kg, quercetin significantly lowered plasma TBARS and lipid hydroperoxides when given to rats with streptozotocin-induced diabetes for 45 d (26,27). A very recent report indicates that quercetin is also able to partially prevent serum nitric oxide increases in streptozotocin-treated rats (28).

The liver is the main organ of oxidative and detoxifying processes, as well as free radical reactions; in many diseases, biomarkers of oxidative stress are elevated in the liver at an early stage (29). Because liver is subjected to ROS-mediated injury in diabetes (30), our experiments were performed to investigate the potential protective effects of quercetin treatment on liver oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and iNOS expression in an experimental model of chronic hyperglycemia. We used a dose of quercetin likely to be achieved in humans (25,26) and previously reported to induce maximal beneficial effects in different liver diseases (21,25).

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and experimental procedure.** Male Wistar rats (Panlab) were caged at 24°C, with a 12-h light:dark cycle and free access to food (standard diet for rats Panlab A04<sup>3</sup>) and water until the time of experiments. The rats were randomly divided into 4 groups. In 2 groups, diabetes was induced by a single i.p. injection of streptozotocin (70 mg/kg body weight; Sigma Chemical) in freshly prepared 10 mmol/L sodium citrate, pH 4.5. Five days after the streptozotocin injection, plasma glucose concentration was measured using tail vein blood samples obtained from rats after overnight food deprivation. A plasma glucose level > 14 mmol/L was considered indicative of diabetes. The experimental groups comprised the normal control group (C:  $n = 8$ ); normal rats treated daily with quercetin (CQ: 150  $\mu$ mol/kg body weight suspended given immediately before i.p., administration in 500  $\mu$ L of a 0.2% Tween aqueous solution for 8 wk,  $n = 8$ ). The diabetic groups were untreated (D:  $n = 8$ ) or treated with quercetin (DQ:  $n = 8$ ). Quercetin treatment was initiated 5 d after the administration of streptozotocin. Rats in both the C and DC groups were administered 500  $\mu$ L/d of vehicle, i.p. for 8 wk.

The rats were killed by exsanguination 8 wk after administration of streptozotocin. Blood samples were centrifuged at 1800  $\times$  g for 15 min to obtain plasma and the livers were excised, weighed, and immediately frozen at -70°C. All experiments were performed in accordance with the NIH guidelines (31) and consent was provided by the Ethical Committee of the University of León.

**Plasma glucose concentration.** Blood plasma glucose was measured spectrophotometrically at a wavelength of 505 nm using a standard assay kit (GOD-PAP, Sigma Chemical).

**Hepatic markers of oxidative stress.** The amount of aldehydic products generated by lipid peroxidation was quantified by the TBA reaction (32) using 3 mg of protein/sample. Spectrophotometric absorbance was determined in the supernatant at 535 nm. Results were referred to as TBARS. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence (QL) (33) was measured by a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode.

**Hepatic antioxidant enzyme activities.** Frozen liver from each rat was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mmol/L, phosphate 20 mmol/L, pH 7.4) and centrifuged at 14,000  $\times$  g for 10 min. Catalase (EC 1.11.1.6) activity was determined by measuring

the exponential disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm and was expressed as U/g protein (34). The assay of cytosolic glutathione peroxidase (EC 1.11.1.19) was carried out according to Flohe and Guntzler (35). Cumene hydroperoxide was used as the substrate, and 1 U of enzymatic activity was defined as the amount of protein that oxidizes 1  $\mu$ mol of reduced NADPH/min. Cytosolic superoxide dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) was assayed according to Misra and Fridovich (36) at 30°C. The rate of autooxidation of epinephrine, which is progressively inhibited by increasing amounts of SOD in the homogenate, was monitored spectrophotometrically at 560 nm. The amount of enzyme that inhibits epinephrine autooxidation at 50% of the maximum inhibition was defined as 1 U of SOD activity.

**Western blot.** Protein extraction and Western blotting were performed as described (25). Membranes were probed with polyclonal anti-I $\kappa$ B kinase (IKK) $\alpha$ , anti-IKK $\alpha/\beta$ , anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-I $\kappa$ B $\beta$ , or anti-iNOS antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Bound primary antibody was detected with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (DAKO) by chemiluminescence. The density of the specific IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , and iNOS bands was quantitated with an imaging densitometer.

**Electrophoretic mobility shift assay.** Nuclear extracts were prepared from liver lysates as described previously (37). Activation of transcription factor NF- $\kappa$ B was examined using consensus oligonucleotides of NF- $\kappa$ B (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'). Probes were labeled by T4 polynucleotide kinase. Binding reactions included 10  $\mu$ g of nuclear extracts in incubation buffer [50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L mercaptoethanol, 20% glycerol and 1  $\mu$ g poly (dl-dC)]. After 15 min on ice, the labeled oligonucleotide (10,000 dpm) was added and the mixture incubated for 20 min at room temperature. For competition studies, 3.5 pmol of unlabeled NF- $\kappa$ B oligonucleotide (competitor) or 3.5 pmol of labeled NF- $\kappa$ B oligonucleotide mutate (noncompetitor) were mixed 15 min before the incubation with the labeled oligonucleotide. The mixture was electrophoresed through a 6% polyacrylamide gel for 90 min at 220 V. The gel was then dried and autoradiographed at -70°C overnight. Signals were analyzed densitometrically.

**Statistical analysis.** Means and SEM were calculated. Data were analyzed using a 2 (diabetic and nondiabetic rats)  $\times$  2 (quercetin-treated and quercetin-untreated rats) ANOVA. Post hoc comparisons were carried out using the Newman Keuls test. Statistical significance was set at  $P < 0.05$ . SPSS+ version 13.0 statistical software was used.

## RESULTS

**Blood glucose.** Glucose concentration in the blood plasma of streptozotocin-treated rats was significantly higher (~2-fold) than in the normal control group and was not affected by quercetin treatment (Table 1).

**Hepatic markers of oxidative stress.** Neither markers of oxidative stress nor activities of antioxidant enzymes were modified by quercetin in normal rats (Table 1). The cytosolic concentration of TBARS was 56% greater in diabetic rats than in controls, whereas concentrations in the diabetic rats receiving quercetin did not differ from controls (Table 1). Streptozotocin administration also induced a significant increase in chemiluminescence (+46%) that was prevented by quercetin (Table 1).

**Hepatic antioxidant enzymes.** SOD activity was 34% greater in liver of diabetic rats compared with controls, and quercetin treatment of diabetic rats reduced SOD to a level less than that of controls. Catalase activity was significantly altered by diabetes (+130% vs. C), and this effect was prevented by quercetin treatment. Glutathione peroxidase activity was not affected by either streptozotocin or quercetin (Table 1).

**Hepatic NF- $\kappa$ B activation.** Quercetin did not affect NF- $\kappa$ B binding activity in controls. Experimental diabetes

<sup>3</sup> The composition of the standard diet was: 15.4% protein, 2.9% fat, 60.5% carbohydrate, 3.9% fiber, 5.3% minerals, and 12% water.

TABLE 1

Effect of streptozotocin-induced diabetes and quercetin on plasma glucose concentration and hepatic markers of oxidative stress and antioxidant enzyme activities in rats<sup>1</sup>

	C	CQ	D	DQ	ANOVA		
					D	Q	D × Q
Plasma glucose, mmol/L	7.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	31.9 ± 8.3 <sup>b</sup>	25.6 ± 4.9 <sup>b</sup>	0.001	NS <sup>2</sup>	0.034
TBARS, nmol/mg protein	0.30 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.29 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.49 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.28 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.010	0.032	0.034
QL, AU	4320 ± 560 <sup>a</sup>	5108 ± 720 <sup>a</sup>	6870 ± 1104 <sup>b</sup>	4106 ± 790 <sup>a</sup>	NS	0.011	0.002
Catalase, pmol/(mg protein · min)	4.0 ± 0.8 <sup>a</sup>	4.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	8.5 ± 1.9 <sup>b</sup>	4.3 ± 2.1 <sup>a</sup>	0.001	0.001	0.002
SOD, U/mg protein	11.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	11.4 ± 2.1 <sup>b</sup>	15.9 ± 1.7 <sup>c</sup>	7.8 ± 1.6 <sup>a</sup>	NS	0.001	0.001
Glutathione peroxidase, nmol/(mg protein · min)	1206 ± 123	998 ± 141	1120 ± 210	1181 ± 325	NS	NS	NS

<sup>1</sup> Values are means ± SEM, n = 8. Means in a row with superscripts without a common letter differ, P < 0.05.

<sup>2</sup> NS, P ≥ 0.05.

markedly induced NF-κB (+71% vs. C), an effect that was abolished by quercetin treatment (Fig. 1).

**Hepatic IKK and IκB protein levels.** Protein levels of IKKs and IκBs did not differ between untreated and quercetin-treated controls (Fig. 2). The protein level of IKKα was upregulated (+164% vs. C; Fig. 2B) and IκBα protein level was decreased (-46% vs. C; Fig. 2B) in rats administered streptozotocin. These effects were prevented by quercetin.

**Hepatic iNOS expression.** The iNOS protein level did not differ between untreated and quercetin-treated control rats. Diabetes significantly induced iNOS protein (+84% vs. normal controls), and quercetin abolished this effect (Fig. 3).

DISCUSSION

In the present study, it was apparent that quercetin did not have a substantial effect on blood glucose levels. This observation coincides with previous reports on the effects of the antioxidant α-lipoic acid (38,39), but differs from the results of Mahesh and Menom (27) or Coskum et al. (28), who found a hypoglycemic effect of quercetin when given to streptozotocin-diabetic rats. These apparently conflicting results are explained by the fact that in our study, quercetin was given after diabetes had been established, whereas in the previous studies, quercetin treatment, which partially prevents degeneration of β-cells (28), began before the induction of diabetes.

Increased levels of TBARS, an end product of lipoperoxidation, were found previously in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats (40,41). Both changes in the concentration of TBARS and the hydroperoxide-initiated QL confirm this finding, indicating increased overall oxidative stress in diabetic rats. Results from the present study also suggest an amelioration of oxidative stress by quercetin, coinciding with the decreased plasma levels of hydroperoxides and TBARS recently reported by other authors (27).

Oxidative stress is the result of a redox imbalance between the generation of ROS and the compensatory response from the endogenous antioxidant network. There is no consensus concerning changes in the activities of antioxidant enzymes of different organs in diabetic rats. Although some studies measuring activities of SOD, catalase, and glutathione peroxidase in diabetes mellitus showed reductions in the levels of these enzymes (28,42–44), other authors reported increased activities in streptozotocin-induced diabetic rats (40,45–47). These apparently contradictory results could be due to tissue specificity, variation in severity and duration of the disease, or other experimental conditions (37). In the present study, catalase

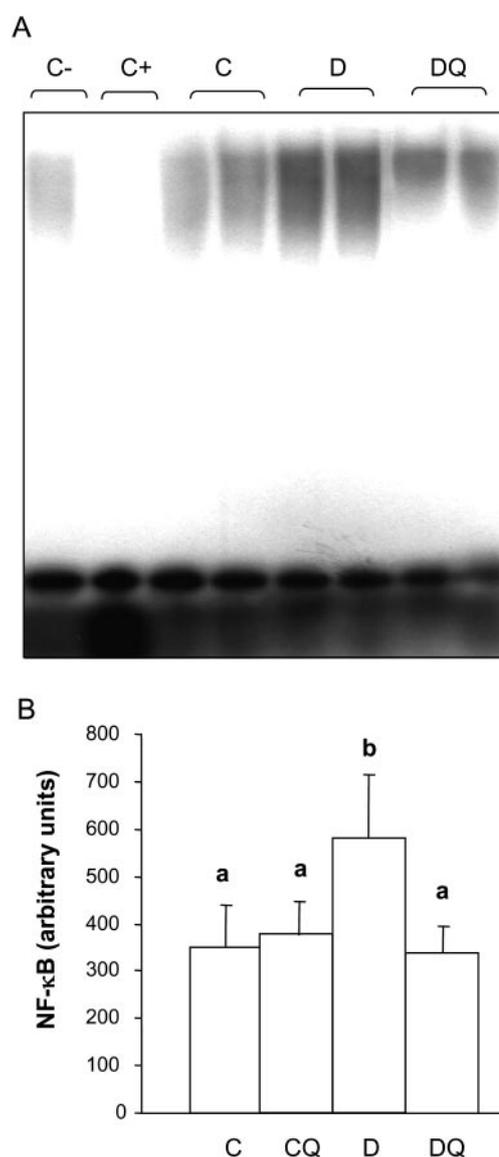
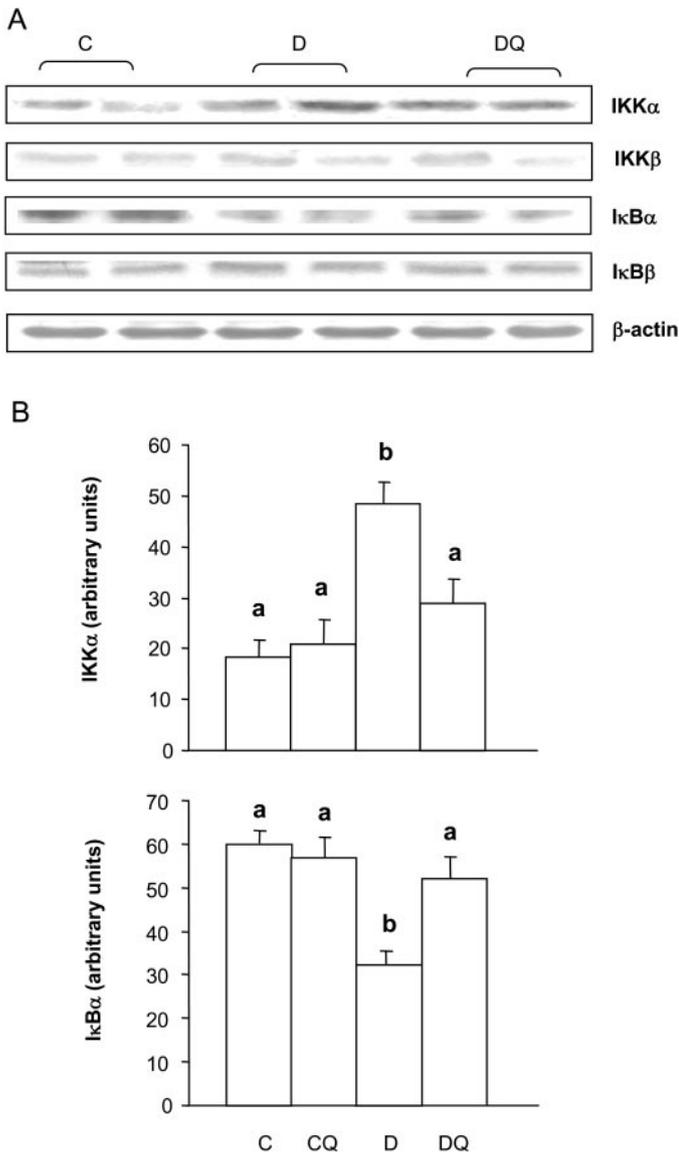


FIGURE 1 Effect of streptozotocin-induced diabetes and quercetin on NF-κB activation in rat liver. Specific binding was verified by the addition of unlabeled (cold) oligonucleotide (competitor, C-) or labeled oligonucleotide mutate (noncompetitor, C+). (A) A representative EMSA. (B) Values are mean ± SEM, n = 8. ANOVA: Q, 0.025; Q × D, 0.001. Means without a common letter differ, P < 0.05.



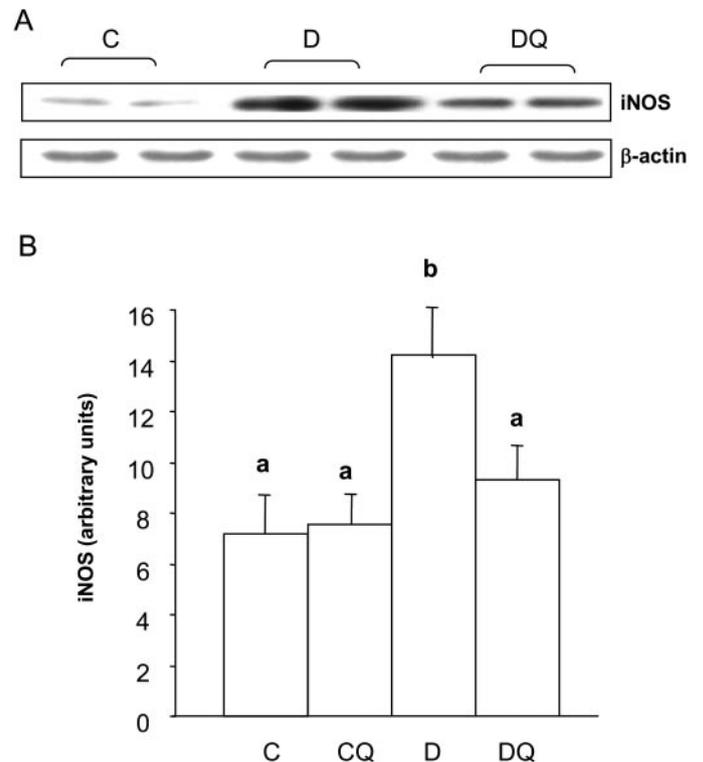
**FIGURE 2** Effect of streptozotocin-induced diabetes and quercetin on Western blot analysis of IKK and I $\kappa$ B proteins in rat liver. Total cellular protein was separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and blotted with anti-IKK or anti-I $\kappa$ B antibodies. (A) A representative Western blot photograph. (B) Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . ANOVA: Q, 0.025; Q  $\times$  D, 0.001. Means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

and SOD activities increased in diabetic rats. The increase in catalase activity may be a compensatory response for an increase in endogenous  $H_2O_2$  production in diabetic liver because insulin deficiency promotes the  $\beta$ -oxidation of fatty acids with resulting  $H_2O_2$  formation (48). The increase in SOD activity could be due to its induction by increased production of superoxide, and  $H_2O_2$  was reported to act as an inducer of tissue SOD (49). The increases in both SOD and catalase activities may thus be an adaptive response for increased oxidative stress in the liver tissue; quercetin, by scavenging ROS, prevents the elevation of those antioxidant enzyme activities in diabetic rat liver. Our data are consistent with those previously described for the effect of  $\alpha$ -lipoic acid (39) or the flavonoid-like compound, caffeic acid phenethyl ester (40), although they differ from the report (27) that both catalase and SOD activities are reduced in erythrocytes of

diabetic animals and normalized after 45 d of quercetin administration.

The molecular mechanisms whereby oxidative stress contributes to organ damage and to the development of diabetic complications are undefined. In a variety of tissues, hyperglycemia and elevated FFA result in the generation of ROS, leading to increased oxidative stress. In the absence of an appropriate compensatory response from the endogenous antioxidant network, the system becomes overwhelmed (redox imbalance), leading to the activation of stress-sensitive signaling pathways, such as NF- $\kappa$ B, and others. In bovine endothelial cells, it was shown that exposure to hyperglycemia initially increased intracellular production of ROS and activated NF- $\kappa$ B (50). It was also found that  $\alpha$ -lipoic acid blocks NF- $\kappa$ B activation in patients with type 2 diabetes (51). In addition,  $\alpha$ -phenyl-*tert*-butylnitron, a spin-trapping agent that reacts with free radical species, significantly reduces the severity of hyperglycemia in both alloxan- and streptozotocin-induced diabetes, coinciding with inhibiting activation of NF- $\kappa$ B (52), and both activation of NF- $\kappa$ B and elevation in oxidative stress are reduced in rats fed a diet supplemented with multiple antioxidants for up to 14 mo (53). These data indicate that activation of NF- $\kappa$ B is an initial signaling event that leads to cellular dysfunction and damage (2) and our finding, extended to liver tissue, that quercetin is able to reduce both oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation, would support the suggestion that oxidative stress is the initial change induced by high glucose, followed by activation of other pathways.

Under normal physiologic conditions, NF- $\kappa$ B forms a complex with its inhibitors, the I $\kappa$ Bs ( $\alpha$  or  $\beta$ ), and is maintained



**FIGURE 3** Effect of streptozotocin-induced diabetes and quercetin on Western blot analysis of iNOS protein in rat liver. Total cellular protein was separated on 12% SDS-polyacrylamide gels and blotted with anti-iNOS antibodies. (A) A representative Western blot photograph. (B) Values are means  $\pm$  SEM,  $n = 8$ . ANOVA: IKK $\alpha$ : D, 0.010; Q, 0.011; Q  $\times$  D, 0.042. I $\kappa$ B $\alpha$ : D, 0.010; Q, 0.032; Q  $\times$  D, 0.034. Means without a common letter differ,  $P < 0.05$ .

in the cytosol in this inactive state. NF- $\kappa$ B can be freed from its inhibitors through the direct action of protein kinases, the IKKs that form a complex consisting of the catalytic subunits IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  and the regulatory subunit IKK $\gamma$  (54). Activation of the IKK complex leads to the phosphorylation of the I $\kappa$ Bs, thus targeting them for polyubiquitination and degradation by the 26S proteasome complex. Freed from its inhibitor, NF- $\kappa$ B enters the nucleus and transactivates NF- $\kappa$ B-responsive genes (55,56). Interestingly, some flavonoids were reported to inhibit NF- $\kappa$ B through the activation of IKK (57), and quercetin potently inhibits both IKK $\alpha$  and IKK $\beta$  in vitro (58). Results from the present study indicate that in streptozotocin diabetic rats, quercetin decreases I $\kappa$ B $\alpha$  degradation by inhibiting upregulation of members of the IKK complex. Effects on the IKK/I $\kappa$ B cascade in turn contribute to inhibition of NF- $\kappa$ B activation.

One major consequence of the activation of stress-sensitive signaling pathways is the generation of gene products such as nitric oxide that cause cellular damage and are ultimately responsible for the late complications of diabetes. Enhanced nitric oxide production may contribute to the hyperfiltration and microalbuminuria that characterize early diabetic nephropathy (59). Diabetes was previously reported to lead to increased activity and expression of liver iNOS in streptozotocin-induced diabetic rats (60) and nitric oxide levels are significantly elevated in diabetic liver at a very early stage (29). In this situation, nitric oxide may react with ROS such as the superoxide radical to yield the highly reactive oxidant species peroxynitrite, leading to more aggressive oxidative and nitrosative stress (61). In the present investigation, quercetin-induced suppression of the release of NF- $\kappa$ B by preventing the degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  was accompanied by downregulation of the expression of iNOS, confirming results in other experimental models such as lipopolysaccharide-activated macrophage cells (62,63) and supporting the previous report that elevations of nitric oxide and nitrotyrosine levels in the retina of diabetic rats are reduced by administration of multiple antioxidants in parallel with an inhibition of NF- $\kappa$ B activation (53).

In summary, the results presented here show that administration of quercetin inhibits oxidative stress, NF- $\kappa$ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-diabetic rats. Quercetin treatment, by abolishing the IKK/NF- $\kappa$ B signal transduction pathway, might block the production of noxious mediators involved in the development of early injury and in the evolution of late complications in different tissues affected by chronic hyperglycemia. Although inhibition by quercetin and other antioxidants of specific pathways that are activated as a consequence of increased oxidative stress and glucose flux may not be sufficient to completely reverse diabetic complications once they have been established, further investigation is warranted to determine whether it may be possible to slow down the progression, or prevent the onset of complications by preemptive therapy before the development of tissue damage. Because the in vivo activity of quercetin depends on its bioavailability, which varies among foods (64), the effectiveness of this flavonoid when it is consumed as a part of the human diet and the required level of dietary intake also warrant further studies. Considering that quercetin inhibits the activation of genes under NF- $\kappa$ B control, another important goal of future studies will be determination of which antioxidants are more effective at preventing NF- $\kappa$ B activation, along with the identification of the molecular sites of action.

## LITERATURE CITED

1. Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism*. 2000;49:27-9.
2. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414:813-20.
3. Baynes W. Chemical modification of protein by lipids in diabetes. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:1159-65.
4. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification. The potential role of 'autooxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J*. 1987;245:243-50.
5. Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med*. 1991;10:339-52.
6. Wojtczak L, Schonfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1183:41-57.
7. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:333-8.
8. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis type 2 diabetes. *Endocr Rev*. 2002;23:599-622.
9. Spitaler MM, Graier WF. Vascular targets off redox signaling in diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2002;45:476-94.
10. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. I. Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation*. 2003;108:1912-6.
11. Stadler K, Jenei V, von Bolcschazy G, Somogyi A, Jakus J. Role of free radicals and reactive nitrogen species in the late complications of diabetes mellitus in rats. *Orv Hetil*. 2004;145:1135-40.
12. Marchioli R, Scweiger C, Levantese G, Gavazzi L, Valagussa F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids*. 2001;36:S53-65.
13. Boaz M, Smetana S, Weinstein T, Matas Z, Gafter U, Iaina A, Knecht A, Weissgarten Y, Brunner D, et al. Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in endstage renal disease (SPACE) randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2000;356:1213-8.
14. Gaede P, Poulsen HE, Parving HH, Pedersen O. Double-blind, randomised study of the effect of combined treatment with vitamin C and E on albuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabet Med*. 2001;18:756-60.
15. Lonn E, Yusuf S, Hoogwerf B, Pogue J, Yi Q, Zimman B, Bosch J, Dagenais G, Mann J, Gerstein H. C. Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care*. 2002;25:1919-27.
16. Hertog MGL, Hollman PCH. Potential health effects of the dietary flavonoid quercetin. *Eur J Clin Nutr*. 1996;50:63-71.
17. Pawlikowska-Pawlega B, Guszecki WI, Misiak LE, Gawron A. The study of the quercetin action on human erythrocyte membranes. *Biochem Pharmacol*. 2003;66:605-12.
18. Huk I, Brovkovich V, Nanobash V, Weigel G, Neumayer C, Partyka L. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surg*. 1998;85:1080-5.
19. Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. *Toxicology*. 2000;154:21-9.
20. Duarte J, Galisteo M, Ocete MA, Pérez-Vizcaino F, Zarzuelo A, Tamargo J. Effect of chronic quercetin treatment on hepatic oxidative status in spontaneously hypertensive rats. *Mol Cell Biochem*. 2001;221:155-60.
21. Peres W, Tuñón MJ, Mato S, Collado PS, Marroni N, González-Gallego J. Hepatoprotective effects of the flavonoid quercetin in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*. 2000;33:742-50.
22. Wadsworth TL, Koop DR. Effects of *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced release of nitric oxide. *Chem Biol Interact*. 2001;137:43-58.
23. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer Lett*. 2001;171:11-6.
24. Yang K, Lamprecht SA, Liu Y, Shinozaki H, Fan K, Leung D. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*. 2000;21:1655-60.
25. Moreira A, Fraga C, Alonso M, Collado PS, Zettler C, Marroni N, González-Gallego J. Quercetin prevents oxidative stress and NF- $\kappa$ B activation in gastric mucosa of portal hypertensive rats. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:1939-46.
26. Muraoka K, Shimizu K, Sun X, Tani T, Izumumi R, Miwa K, Yamamoto K. Flavonoids exert diverse inhibitory effects on the activation of NF- $\kappa$ B. *Transplant Proc*. 2002;34:1335-40.
27. Mahesh T, Menom VP. Quercetin alleviates oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res*. 2004;18:123-7.
28. Coskum O, Kanter M, Korkmaz A, Oter S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and  $\beta$ -cell damage in rat pancreas. *Pharmacol Res*. 2005;51:117-23.
29. Stadler K, Jenei V, Bolcschazy G, Somogyi A, Jakus J. Increased nitric oxide levels as an early sign of premature aging in diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2003;35:1240-51.
30. Seven A, Guzel S, Seymen O, Civelek S, Bolayirli M, Uncu M, Burcak G. Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. *Yonsei Med J*. 2004;45:703-10.
31. National Academy of Sciences. *The Guiding Principles for Research Involving Animals*, Bethesda: National Institutes of Health; 1991.

32. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95:351–8.
33. González-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart, and muscle. *Free Radic Biol Med.* 1991;10:41–7.
34. Chance B, Machley AL. Assays of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 1995;2:764–75.
35. Flohe L, Gunzler WA. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1974;105:115–21.
36. Misra HP, Fridovich I. (1972) The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247:3170–5.
37. Essani NA, McGuire GM, Manning AM, Jaeschke H. Endotoxin-induced activation of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B in hepatocytes, Kupffer cells and endothelial cells in vivo. *J Immunol.* 1996;156:2956–63.
38. Obrosova I, Cao X, Greene DA, Stevens MJ. Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid. *Diabetologia.* 1998;41:1442–50.
39. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Effects of  $\alpha$ -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetics rats. *J Nutr Biochem.* 2003;14:288–94.
40. Yilmaz HR, Uz E, Ucel N, Altuntas I, Ozcelik N. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat liver. *J Biochem Mol Toxicol.* 2004;18:234–8.
41. Cho SY, Park JY, Park EM, Choi MS, Lee MK, Jeon SM, Jang MK, Kim MJ, Park YB. Alteration of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin Chim Acta.* 2002;317:109–17.
42. Ozkaya YG, Agar A, Yargicoglu P, Hacioglu G, Bilmen-Saikcioglu S, Ozen I, Aliciguzel Y. The effect of exercise on brain antioxidant status of diabetic rats. *Diabetes Metab.* 2002;28:377–84.
43. Wahaieb SA, Godin DV. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozotocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes.* 1987;36:1014–8.
44. Sekeroglu MR, Sahin H, Dulger H, Algun E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2000;33:669–74.
45. Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, Karayalcin U. Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med.* 2003;142:172–7.
46. Huang WC, Juang SW, Liu IM, Chi TC, Cheng JT. Changes of superoxide dismutase gene expression and activity in the brain of streptozotocin induced diabetic rats. *Neurosci Lett.* 1999;275:25–8.
47. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 2001;15:143–9.
48. Horie S, Ishii H, Suga T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. *J Biochem.* 1981;90:1691–6.
49. Matkovic B. Effect of plant and animal lesions on superoxide dismutase activities. In: McCord G, Michelson AM, Fridovich I, editors. *Superoxide and superoxide dismutase*. New York: Academic Press; 1977. p. 501–15.
50. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000;404:787–90.
51. Hofmann MA, Schiekofer S, Isermann B, Kanitz M, Henkels M, Joswig M, Treusch A, Morcos M, Weiss T, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative stress-sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B. *Diabetologia.* 1999;42:222–32.
52. Ho E, Chen G, Bray TM. A-Phenyl-tert-butyl nitroen (PBN) inhibits NF- $\kappa$ B activation offering protection against chemically induced diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2000;28:604–14.
53. Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res.* 2003;37:1169–80.
54. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 1997;91:243–52.
55. Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA, Herzeneberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor  $\kappa$ B and transcription of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:9943–7.
56. Romics L, Kodys K, Dolganiuc A, Graham L, Velayudham A, Mandrekar P, Szabo G. Diverse regulation of NF- $\kappa$ B and peroxisome proliferators-activated receptors in murine non-alcoholic fatty liver. *Hepatology.* 2004;40:376–85.
57. Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol.* 1994;56:576–82.
58. Peet GW, Li J. IKK $\alpha$  kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporin and quercetin. *J Biol Chem.* 1999;274:32655–61.
59. Prabhakar SS. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 2004;24:333–44.
60. Madar Z, Kalet-Litman S, Stark AH. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology.* 2004;73:106–12.
61. Llorens S, Nava E. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway. *Curr Vasc Pharmacol.* 2003;1:335–46.
62. Cho, S. Y., Park, S. J., Kwon, M. J., Jeong, T. S., Bok, S. H., Choi, W. Y., Jeong, W. I., Ryu, S. Y., Do, S. H., Lee, C. S., Song, J. C. & Jeong KS. Quercetin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- $\kappa$ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol Cell Biochem.* 2003;243:153–60.
63. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264. 7 macrophage cells. *J Endotoxin Res.* 2001;7:431–8.
64. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81:243S–55.