



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MÉDICA

FRANCISCA KALLINE DE ALMEIDA BARRETO

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DA LECTINA DE
***Bryothamnion seaforthii* EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR**
ESTREPTOZOTOCINA

FORTALEZA

2016

FRANCISCA KALLINE DE ALMEIDA BARRETO

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DA LECTINA DE
Bryothamnion seaforthii EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR
ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia. Área de Concentração: Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

B262a Barreto, Francisca Kalline de Almeida.
Atividade antihiper-glicêmica e antioxidante da lectina de *Bryothamnion seaforthii* em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina/ Francisca Kalline de Almeida Barreto - Fortaleza, 2016.
68 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.
Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2016.

Área de concentração: Patologia.

Orientação: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira.

1. Diabetes Mellitus. 2. Lectinas. 3. Hiperlipidemias. 4. Estresse Oxidativo. I. Título.

CDD 616.462

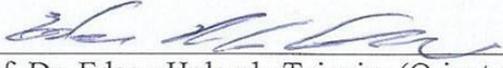
FRANCISCA KALLINE DE ALMEIDA BARRETO

ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIOXIDANTE DA LECTINA DE
Bryothamnion seaforthii EM RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR
ESTREPTOZOTOCINA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia médica da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Patologia. Área de
Concentração: Patologia.

Aprovada em: 17/03/2016.

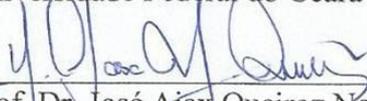
BANCA EXAMINADORA



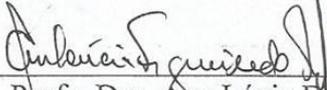
Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Francisco Vassilipe Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. José Ajax Queiroz Nogueira
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

À Deus, que está acima de todas as coisas.
Aos meus amados pais: João e Sandra,
E ao meu otouto Fellipe.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me deu a oportunidade de vencer um sonho.

Aos meus pais, João Barreto Neto e Sandra Feitosa de A. Barreto, aos quais dedico essa conquista e agradeço sempre pelo incentivo e apoio incondicionais, sem falar no amor maior do mundo e na saudade que apertava sempre ao ficar longe da família.

Ao meu *otouto-san* (irmão mais novo), Fellipe de Almeida Barreto, que foi um presente na minha vida, pois mais do que um irmão, você é meu melhor amigo. Obrigada por me aguentar.

À todos da minha família, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e me apoiaram quando precisei, em especial aos meus avós, Dona Elza e seu Tico (*in memorian*) e José Henrique.

Ao meu namorado, Éder Arantes, a quem agradeço sempre por me suportar nesses dias difíceis. Obrigada por todo o apoio, dedicação e carinho, por todo esse companheirismo que me ajudou a vencer os momentos cruciais.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edson Holanda, obrigada por ter me recebido de braços abertos e por todo ensinamento neste curto tempo do convívio. O Sr. é um exemplo de professor e de pessoa. Ao senhor, toda minha admiração.

Aos meus colegas do Laboratório Integrado de Biomoléculas, que são como uma família torta. Agradeço muito a colaboração e o suporte de cada um: Luiz, Bruno, Louise, Mayron, Vavá, e Mayara. E às queridas ICs que sempre nos auxiliaram nos experimentos: Gleiceane, Camila(s), Juliane. Sou grata por cada experiência vivida ao lado de vocês.

Aos colegas de mestrados e grandes amigos: André, Débora, Stelânia. Minha Equipe Master. Obrigada pelo carinho e altas risadas.

A todos os meus amigos distantes, obrigada pelo carinho e paciência sempre.

Aos meus queridos colegas de turma do Mestrado em Patologia 2014, vocês foram parte fundamental deste processo de aprendizagem.

Aos grandes professores que encontrei pelo caminho. Espero poder seguir o exemplo de vocês.

Aos professores Dr. Celso Nagano e ao Dr. Alexandre Holanda Sampaio, coordenadores do Laboratório BIOMAR, por terem cedido gentilmente a lectina do referido estudo.

À Dra. Patty Saldanha, por ter me ajudado com a histologia, agradeço os dias que a Sra. Se disponibilizou para me ajudar nas leituras. Foram de grande valia.

À Éder Almeida, meu primo e a quem admiro muito, agradeço por ter me encaminhado para a vida acadêmica e me direcionado para a orientação do Prof. Edson.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa.

RESUMO

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica, caracterizada por uma desordem metabólica de múltiplas etiologias, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não pode usar de maneira eficaz a que é produzida, ocasionando uma hiperglicemia sistêmica. A causa do diabetes está associada a uma combinação de disfunção das células β -pancreáticas e insulino-resistência, pois a insulina produzida não é capaz de promover adequada captação periférica de glicose. Aproximadamente 7% da população mundial vive com essa doença e 90% destes casos são diabetes tipo 2. O diabetes pode ocorrer associado à hiperlipidemias que podem gerar aumento dos radicais livres produzidos, provocando um estresse oxidativo, que por sua vez provoca uma disfunção endotelial, gerando as complicações conhecidas do diabetes. Visto a complexidade do DM, são necessários mais estudos para fornecer terapias alternativas para seu tratamento. As lectinas possuem a propriedade peculiar de ligação a carboidratos e papel intrínseco na comunicação celular, apresentando uma variedade de efeitos biológicos, tais como antiinflamatórios, pró-cicatrizantes, anticâncer, antiviral e atividade antioxidante. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antihiperglicêmica e antioxidante da lectina de *Bryothamnion seaforthii* (BSL) *in vivo*, assim também, como seu efeito na redução de lipídios. Para esta avaliação, foi induzido diabetes *mellitus* tipo 2 em ratos Wistar, utilizando estreptozotocina e nicotinamida. A eficácia e eficiência do tratamento foram avaliadas a partir de coletas aos períodos de 0, 30, 60, 90 e 120 dias após confirmação da hiperglicemia, com avaliação sérica de glicose de jejum, colesterol total, triglicérides, avaliação das enzimas glutathione peroxidase, catalase, superóxido dismutase, e determinação da resistência à insulina por meio do HOMA-IR (modelo de avaliação da homeostase na resistência à insulina) e HOMA β (modelo de avaliação da homeostase na disfunção das células β). No estudo, observou-se que os grupos tratados com BSL nas suas três concentrações obtiveram redução significativa da quantidade de glicose de jejum, colesterol total e triglicérides, assim também, como aumentaram significativamente a atividade enzimática de glutathione peroxidase e superóxido dismutase, não sendo observada nenhuma diferença em relação à enzima catalase. Por fim, com as avaliações dos índices HOMA-IR e HOMA- β , observou-se que a administração de BSL diminuiu significativamente a resistência à insulina e a hipersecreção da mesma, pelas células β . Em conclusão, estes dados propõem que BSL promove eficaz efeito hipoglicemiante e hipolipídico, além de diminuir a resistência à insulina e melhorar a função das células β , atuando também, na melhoria da atividade enzimática no estresse oxidativo causado pelo DM2.

Palavras-chave: Diabetes, lectinas de algas, hiperlipidemias, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is a chronic disease characterized by metabolic disorder of multiple etiologies, which occurs when the pancreas does not produce enough insulin or when the organism cannot effectively use the insulin produced, causing systemic hyperglycemia. The cause of diabetes is associated with a combination of dysfunction of pancreatic β -cells and insulin resistance, because the insulin produced is not capable of providing adequate peripheral glucose uptake. Approximately 7% of the world population lives with the disease and 90% of the cases are type 2 diabetes. Diabetes associated with hyperlipidemia may occur and generate increased production of free radicals, causing oxidative stress, which in turn causes endothelial dysfunction. Since the complexity of the DM, more studies are needed to provide alternative therapies for their treatment. Lectins have the peculiar property of binding to carbohydrates and display intrinsic role in cell communication, featuring a variety of biological effects, such as anti-inflammatory, pro-healing, anti-cancer, antiviral and antioxidant activities. This study aimed to evaluate the antihyperglycemic, antilipidemic and antioxidant activities of the lectin isolated from *Bryothamnion seaforthii* (BSL) thorough an *in vivo* study. For this evaluation, diabetes *mellitus* type 2 was induced in Wistar rats using streptozotocin and nicotinamide. The effectiveness and efficiency of the treatment were evaluated from serum collections at 0, 30, 60, 90 and 120 days after confirmation of hyperglycemia with serum assessment of fasting glucose, total cholesterol, triglycerides, evaluation of the enzymes glutathione peroxidase, catalase, superoxide dismutase, and determination of the insulin resistance by HOMA-IR (homeostasis model assessment for insulin resistance) and HOMA β (homeostasis model assessment e-cell function). In the study, it was observed that the groups treated with BSL were significantly reduced regarding the amount of fasting glucose, total cholesterol and triglycerides, as well as significantly increased the glutathione peroxidase activity. Superoxide dismutase difference was not observed with regard to catalase. Finally, regarding the assessments of HOMA-IR and HOMA- β levels, it was observed that BSL administration decreased insulin resistance and hypersecretion. In conclusion, these data suggest that BSL promotes hypoglycemic and hypolipidemic effect, and reduce insulin resistance as well as improve the function of β cells, also working improving the enzymatic activity in the oxidative stress caused by DM2.

Key words: Diabetes, lectins algae, hyperlipidemia, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fisiopatologia da disfunção das células β e insulinoresistência da DM2, devido ao estresse oxidativo.....	24
Figura 2. Mecanismo bioquímico de ação da insulina periférica na captação de glicose.....	28
Figura 3. Classificação das lectinas de acordo com sua estrutura.....	34
Figura 4. Níveis de glicemia de jejum de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	45
Figura 5. Níveis de colesterol total de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	47
Figura 6. Níveis de triglicérides de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	48
Figura 7. Quantificação enzimática de Superóxido Dismutase (SOD) em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	50
Figura 8. Quantificação enzimática de Catalase (CAT) em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	51
Figura 9. Quantificação enzimática de Glutathiona Peroxidase (GPx) em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120	52
Figura 10. Níveis de HOMA-IR de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120.....	54
Figura 11. Níveis de HOMA- β de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120	55
Figura 12. Fotomicrografia de células hepáticas (aumento em 200x).....	59

Figura 13 Fotomicrografia de células pancreáticas (aumento em 200x).....	60
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Tratamentos utilizados nos grupos experimentais.....	41
Tabela 2:	Média dos grupos com relação à avaliação pancreática.....	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Valores de referência para testes recomendados para o diagnóstico de DM.....	23
Quadro 2 – Medicamentos antidiabéticos: mecanismos de ação e efeito clínico.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADA - Associação Americana de Diabetes
- ADP - Adenosina difosfato
- AGEs - Produtos finais da glicação avançada
- ALT – Alanina aminotransferase
- AMPK-ACC - proteína quinase ativada por AMP
- ATP – Adenosina trifosfato
- BSL - lectina de *Bryothamnion seaforthii*
- BTL - lectina de *Bryothamnion triquetum*
- CEPA - Comitê de Ética em Pesquisa Animal
- Con A - Concanavalina A
- CO₂ – Dióxido de carbono
- Da - Dálton
- dL - Decilitro
- DM1 - Diabetes *mellitus* tipo 1
- DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
- FID - FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES
- FPG - Glicose no plasma em jejum
- FPI- Insulina no Plasma em jejum
- g - Grama
- GLUT - Receptor de glicose
- GPx - Glutationaperoxidase
- HbA1C – Hemoglobina glicada
- H₂O - Água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HA - Hipertensão Arterial

HDL-c - Lipoproteína de alta densidade (High-density lipoprotein)

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HOMA-IR - Modelo de Avaliação da Homeostase (*homeostasis model assessment for insulin resistance*)

HOMA β - Modelo de Avaliação da Homeostase (*Homeostasis Model Assessment E-Cell Function*)

H&E – Hematoxilina e eosina

IRS - Receptor de insulina

kDa - quilodáton

Kg - Quilograma

L - Litro

M - mol

m - Metro

mg - Miligrama

ml – Mililitro

mM - milimolar

mmol - milimol

NaCl – Cloreto de Sódio

NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF-kB - Fator nuclear kappa potenciador de células B

O₂ - Oxigênio

OH⁻ - Hidroxila

OMS - Organização Mundial de Saúde

PDK – Proteína quinase dependente de fosfatidilinositol

PIP3 – Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato

PI3K – Fosfatidilinositol 3 quinase

RI - Resistência à insulina

RL - Radicais Livres

RPM- Rotações por minuto

RTq-PCR – Reação de cadeia da polimerase em tempo real

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SOD - Superóxido-desmutase

STZ - Estreptozotocina

TxLC - (*first Tulipa hybrid lectin with complex specificity*)

UV- Ultra Violeta

μU – microunidade

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

α - Alfa

β - Beta

® - Marca Registrada

°C - Graus centígrados

> - Maior que

< - Menor que

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Diabetes mellitus	20
1.1.1 Classificação	20
1.1.2 Epidemiologia	21
1.1.3 Diagnóstico	22
1.1.4 Mecanismo de ação da insulina	23
1.1.5 Estresse oxidativo	24
1.1.6 Tratamento do diabetes	28
1.2 Diabetes induzido por estreptozotocina	31
1.3 Lectinas	33
1.3.1 Breve histórico e classificação	33
1.3.2 Lectinas de algas marinhas	34
1.3.3 Atividade biológica de lectinas	36
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivos primários	39
3.2 Objetivos secundários	39
4. MÉTODOS	40
4.1. Lectina	40
4.2 Animais experimentais	40
4.3 Indução do diabetes por estreptozotocina	40
4.4 Tratamento	41
4.5 Testes bioquímicos	41
4.5.1 Glutathione peroxidase (GPx)	42
4.5.2 Superóxido dismutase (SOD)	42
4.5.3 Catalase (CAT)	42
4.5.4 HOMA-IR	43
4.5.5 HOMA-β	43
4.6 Análise Histopatológica	43
4.7 Análise estatística	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus*

1.1.1 Classificação DM

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica, caracterizada por uma desordem metabólica de múltiplas etiologias, que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o organismo não pode usar eficazmente a que é produzida naturalmente. Com isto, há um aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia), que inclusive pode gerar distúrbios graves no metabolismo de macromoléculas como carboidratos, lipídios e proteínas (SILVA, 2011; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2015).

Em 1866, um médico inglês chamado G. Harley observou que existiam pelo menos duas formas diferentes de DM. Contudo, a primeira evidência direta de que a forma de início precoce (juvenil) diferia do adulto pela ausência de insulina circulante veio em 1951, com o desenvolvimento de um bioensaio para a detecção de insulina no sangue. Pouco depois se relatou que os extratos de pâncreas de diabéticos juvenis tinham níveis de insulina quase indetectáveis (ARIAS-DÍAZ; BALIBREA, 2007).

A classificação do DM baseava-se no tipo de tratamento, e os casos eram divididos em "DM insulino dependente" e "DM insulino independente". Porém, a classificação atual proposta pela OMS e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) aboliu essas nomenclaturas e classifica os tipos de DM pela sua etiologia, que inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SBD, 2015).

De acordo com a OMS (2015), o diabetes tipo 1 (DM1) geralmente se desenvolve na infância e adolescência e os pacientes necessitam de injeções de insulina ao longo da vida para a sobrevivência. Esse tipo de DM pode ocorrer em qualquer idade, mas na maioria da população, a incidência é maior do nascimento até os 14 anos de idade. O DM tipo 1 resulta primariamente da destruição das células β pancreáticas causadas por doença auto-imune ou sem causa conhecida, com consequente deficiência de insulina. A susceptibilidade genética é importante, mas não suficiente como causa isolada. Outros fatores incluem: condições ambientais tais como início de convívio social, infecções virais, toxinas e dieta (FOROUHI; WAREHAM, 2014; SBD, 2015).

O DM tipo 2 é uma doença metabólica complexa caracterizada por uma redução da secreção pancreática de insulina, uma diminuição da sua ação ou resistência desta nos órgãos periféricos. Ela se desenvolve geralmente na idade adulta, após os 40 anos de idade e está relacionada com a obesidade, falta de atividade física e dietas pouco saudáveis. Este é o tipo mais comum de diabetes representando 90% dos casos em todo o mundo. O tratamento pode envolver mudanças de estilo de vida e perda de peso por si só, medicamentos orais ou mesmo injeções de insulina (FOROUHI; WAREHAM, 2014; OMS, 2015; SBD, 2015). O DM2 é um problema crescente de saúde em todo o mundo, sendo a forma predominante de diabetes (LEE; JEON, 2013).

Hoje em dia são reconhecidos alguns subtipos de DM2 secundários tais como síndrome juvenil de diabetes do adulto, síndromes de resistência grave à insulina e a chamado diabetes mitocondrial (ARIAS-DÍAZ; BALIBREA, 2007).

1.1.2 Epidemiologia

Atualmente, há 382 milhões de pessoas vivendo com diabetes no mundo, correspondendo a 8,3% de todos os adultos. Cerca de 80% do total de indivíduos com DM vivem em países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens. Entre 1980 e 2008, cerca de 194 milhões de casos adicionais de diabetes ocorreram, e destes 70% foram atribuíveis ao crescimento da população e envelhecimento (DANA EI, 2011). O número de pessoas com diabetes deverá atingir níveis mais do que alarmantes em 2040, estimando-se que 642 milhões de pessoas terão a doença (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES - FID, 2013).

De acordo com a OMS (2015), há 1,5 milhões de mortes por ano diretamente relacionadas ao diabetes. No início do século XXI, estimou-se que 5,2% de todos os óbitos no mundo foram atribuídos ao diabetes, o que torna essa doença a quinta principal causa de morte.

Hoje no Brasil, há mais de 13 milhões de pessoas vivendo com essa doença, o que significa quase 6,9% da população. Dados brasileiros de 2011 mostram que as taxas de mortalidade por DM (por 100 mil habitantes) eram de 30,1 para a população geral, 27,2 nos homens e 32,9 nas mulheres, com acentuado aumento com o progredir da idade. O número de óbitos em 2014 foi de 116.383 mil e os custos correspondentes foram de 1.527,6 dólares americanos por indivíduo ao ano, gerando um custo total para

o sistema público de saúde em torno de 3,9 bilhões de dólares americanos por ano (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - SBD, 2015).

A prevalência da doença é menor em áreas rurais de países em desenvolvimento, geralmente intermediária nos países desenvolvidos, e mais elevada em determinados grupos étnicos. As populações com a maior prevalência de DM2 tem uma alta prevalência de obesidade, e aumenta acentuadamente com a idade em ambos os sexos (FOROUHI; WAREHAM, 2014).

1.1.3 Diagnóstico do DM

A evolução para o DM2 ocorre ao longo de um período de tempo variável, passando por estágios intermediários que recebem a denominação de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída (SBD; 2015).

Os principais fatores de risco etiológicos para o DM são: idade, obesidade (índice de massa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$), histórico familiar, hipertensão arterial (HA), DM gestacional e inatividade física. Há também fatores dietéticos de risco que foram associados ao maior desenvolvimento do DM, como: o alto consumo de carne vermelha e processada, bebidas adoçadas com açúcar e reduzida ingestão de frutas e legumes, bem como consumo de alguns tipos de produtos lácteos (FOROUHI; WAREHAM, 2014, SBD; 2015).

No que se refere à hereditariedade, a predisposição para a resistência à insulina e/ou disfunção da célula β é herdada de uma forma não mendeliana, devido à sua heterogeneidade genética e patogênese envolvendo vários genes (ARIAS-DÍAZ; BALIBREA, 2007).

Os fatores de risco ambientais e alimentares associados com a predisposição genética podem levar ao desenvolvimento do DM2. Os sintomas iniciais da hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, polifagia e perda de peso (MORA *et al.*, 2009).

Para a confirmação do DM, são aceitos atualmente três critérios, os sintomas de poliúria, polidipsia, polifagia e perda ponderal tem que ser associados à: glicemia casual $> 200 \text{ mg/dL}$, glicemia de jejum $\geq 126 \text{ mg/dL}$ (7 mmol/L) ou glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose $> 200 \text{ mg/dL}$ (SBD, 2015). Estes critérios de diagnóstico foram estabelecidos pela ADA em 1997, com base na observação que esses valores

estão fortemente associados com um aumento na incidência de complicações microvasculares, tais como retinopatia (SMUSHKIN; VELLA, 2010).

Recentemente, a ADA e a OMS, além de outras organizações aprovaram o uso de HbA1c (hemoglobina glicada) para o diagnóstico de diabetes com um *cut-off* de > 6,5% (48 mmol / mol) em um laboratório padronizado (FOROUHI; WAREHAM, 2014).

Pré-diabetes tem sido um termo usado para descrever situações em que há anormalidades do metabolismo da glicose, mas os critérios de diabetes não são cumpridos (SMUSHKIN; VELLA, 2010). Os valores dos exames laboratoriais para a classificação do DM se encontram no quadro 1.

Quadro 1: Valores de referência para testes recomendados para o diagnóstico de DM			
Categoria	HbA1c	Glicemia de jejum (mg/dL)	Glicemia de 2h após 75g de glicose (mg/dL)
Glicemia Normal	< 5,7	< 100	< 140
Pré-diabetes	5,7 – 6,4	100 – 125	140 – 199
Diabetes <i>mellitus</i>	≥ 6,5	≥ 126	≥ 200

Fonte: CAVAGNOLLI *et al.*, 2010

Marcadores como o *homeostasis model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR), são usados corriqueiramente e apresentam, sobretudo, a vantagem de serem calculados a partir de uma única amostra de sangue obtida em jejum. Esse marcador é calculado pela fórmula $[(FPI \mu U/mL \times FPG \text{ mmol/L}) / 22,5]$, onde: FPI - insulina no plasma em jejum, FPG – glicose no plasma em jejum e 22,5 foi o valor de resistência descrito como porcentagem da população de referência (MADEIRA *et al.*, 2008; SBD, 2015).

Os pacientes com DM2 apresentam um quadro clínico mais silencioso e algumas vezes podem vir a ser diagnosticados já pelos sintomas das complicações crônicas (WEINERT *et al.*, 2010).

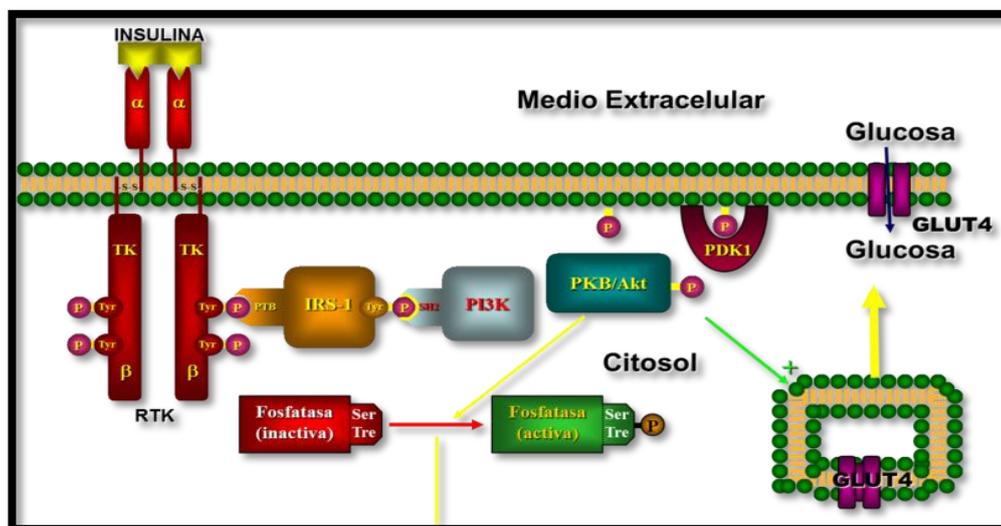
Como o DM é uma doença crônica e metabólica, pode levar ao desenvolvimento, em longo prazo, de sérios danos ao coração, vasos sanguíneos, olhos, rins e nervos (OMS, 2015). O aumento da mortalidade cardiovascular dos pacientes diabéticos está relacionado ao estado diabético *per se* e à agregação de vários fatores de risco cardiovasculares, como obesidade, hipertensão arterial (HA) e dislipidemia entre

outros. Cerca de 60 a 80% dos óbitos de pacientes portadores de DM, dá-se por doenças cardíacas ou vascular encefálica (BUSE *et al.*, 2007). A HA tem particularidades quando presente em um ou outro tipo de DM. No tipo 2, a HA faz parte do espectro da síndrome metabólica, estando presente em cerca de 50% dos pacientes no momento do diagnóstico do DM. As alterações lipídicas mais frequentes na população diabética são a hipertrigliceridemia, HDL-colesterol (HDL-c) baixo e alterações qualitativas nas lipoproteínas (SBD, 2015). Logo, o DM é um importante problema de saúde pública estando associado a complicações que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevivência dos indivíduos, além de envolver altos custos no seu tratamento e das suas complicações (SBD, 2015).

1.1.4 Mecanismo de ação da insulina

A concentração plasmática de glicose é controlada pela ação da insulina, um hormônio peptídico composto por 51 aminoácidos que é sintetizado, armazenado e secretado nas células β do pâncreas. Tais células β encontram-se localizadas nas ilhotas de Langerhans, grupos especializados de centenas a milhares de células endócrinas que estão anatômica e funcionalmente separadas do tecido pancreático exócrino. Elas funcionam como sensores que, em resposta a determinados estímulos glicêmicos, secretam uma quantidade apropriada de insulina para o sangue (LOPES *et al.*, 2008).

Figura 1: Mecanismo bioquímico de ação da insulina periférica.



Fonte figura: Departamento de Bioquímica da Escola Luis Razetti

O mecanismo da insulina periférica, explicitado na figura 1 é detalhado da seguinte maneira: a insulina liga-se a um receptor que sofre dimerização e autofosforilação dos resíduos de tirosina, gerando sítios de ligação para substratos do receptor de insulina (IRS), que se ligará a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), ativando-a. A PI3K irá catalisar a conversão do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP3), ativando a proteína quinase dependente de fosfatidilinositol (PDK), que ativará outras quinases, como a Akt, que ativa as vesículas contendo GLUT-4 para a membrana plasmática para captar glicose (BERG *et al.*, 2014). Além desse mecanismo, há a glicoquinase (um sensor de glicose) e o próprio metabolismo da glicose, que estimulam sua captação (LOPES *et al.*, 2008).

Existem vários receptores de insulina descritos, como o GLUT-1, GLUT-2, GLUT-3 e GLUT-4, cada um com propriedades distintas. Porém os mais descritos são o GLUT-1, presente nos músculos esqueléticos e responsáveis pela captação basal de glicose e GLUT-4, presente nos hepatócitos e adipócitos (BERG *et al.*, 2014).

É reconhecido na atualidade que o desenvolvimento do DM2 está associado a uma combinação de disfunção das células β -pancreáticas e insulino-resistência. As células β conseguem compensar a resistência à insulina através de um incremento na secreção desta (hiperinsulinemia), mas, com o tempo, uma compensação insuficiente pode levar à instalação de um estado de intolerância à glicose (LOPES *et al.*, 2008; BERG *et al.*, 2014).

A resistência insulínica (RI) é definida como a ineficiência da insulina plasmática que sob concentrações usuais pode promover adequada captação periférica de glicose e suprimir a gliconeogênese hepática. A RI também afeta o efeito da insulina em adipócitos, resultando em aumento da lipólise e consequente elevação das concentrações de ácidos graxos livres (MADEIRA *et al.*, 2008). E além da RI, outro parâmetro importante é a eficácia da glicose em, por si só, estimular a sua própria captação e reprimir a sua própria liberação (SMUSHKIN; VELLA, 2010).

1.1.5 Estresse oxidativo no DM

Existe um consenso de que o diabetes pode ocorrer com estresse oxidativo, que por sua vez provoca uma disfunção endotelial e gera complicações como retinopatias,

nefropatias, neuropatias e distúrbios endócrinos. O papel do estresse oxidativo nessas complicações tem sido alvo de muito interesse (REIS *et al.*, 2008).

Radicais livres (RL) referem-se a átomos ou moléculas altamente reativas, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas, o que faz com que elas possam reagir com químicos inorgânicos e orgânicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Estas moléculas podem ser geradas no citoplasma, mitocôndrias ou na membrana plasmática, pela alimentação inadequada, aumento da atividade física, tabagismo, álcool e outros fatores (BARBOSA *et al.*, 2010). Podem ser produzidos também, por macrófagos e neutrófilos durante a inflamação. Aparecem igualmente como produtos da mitocôndria catalisados pela reação de transporte de elétrons e outros ou mesmo produzidos por peroxissomos (VALKO *et al.*, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são RL derivados do oxigênio podendo ser produzidos durante a respiração e geração de energia mitocondrial (KUMMAR *et al.*, 2008). Se houver redução do oxigênio com número menor de elétrons, haverá produção de EROs.

Os exemplos mais comuns de EROs formados no organismo são:

Superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$): É formado após a primeira redução do O_2 . O radical superóxido ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos (MAGDER, 2006).

Hidroxila ($H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^\cdot$): É considerado o ERO mais reativo em sistemas biológicos. Ele pode gerar danos diretos ao DNA (ácido desoxirribonucléico), pode inativar várias proteínas (enzimas e membrana celular), ao oxidar seus grupos sulfidrilas (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Peróxido de hidrogênio ($O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$): Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o H_2O_2 é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o OH^\cdot (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As células respondem ao estresse oxidativo aumentando a produção de varredores de radicais livres. Trata-se de um sistema enzimático que converte os produtos da oxidação em moléculas não tóxicas. A enzima superóxido-dismutase (SOD)

converte o ânion superóxido em H_2O_2 e O_2 . A catalase converte H_2O_2 em H_2O e O_2 . A glutationa peroxidase (GPx) converte H_2O_2 em H_2O (GATÉ *et al.*, 1999).

Quando a produção de EROs é aumentada ou os sistemas antioxidantes são deficientes, o resultado é o excesso desses radicais, uma condição chamada de estresse oxidativo, estado prejudicial para o organismo que induz danos celulares podendo levar à morte celular (YOSHIKAWA; NAITO, 2002). Além do mais, os RL e EROs iniciam reações autocatalíticas, isto é, as moléculas que reagem com os RL são, por sua vez, convertidas em RL, propagando a cadeia de danos (KUMMAR *et al.*, 2008).

Acredita-se que os EROs desempenham um papel fundamental na patogênese das complicações diabéticas mais tardias, devido à sua capacidade para oxidar diretamente lipídios, proteínas e DNA. Além disso, eles podem alterar processos bioquímicos sensíveis ao estresse, podendo gerar alterações celulares que, em último caso, são igualmente responsáveis pelo aparecimento das complicações do diabetes, aumentando assim, a resistência à insulina e diminuição da sua secreção (HOUSTIS *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2008).

Uma vez instalada a hiperglicemia, os efeitos glicotóxicos incluem o aumento do estresse oxidativo no pâncreas, reduzindo ulteriormente a secreção de insulina, formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), ativação da via dos polióis e também mudanças no conteúdo e atividade do sistema de defesas antioxidantes no tecido (SILVA, 2011; SBD, 2015).

EROs causam danos *in vitro* à via de sinalização da insulina, diminuição da translocação dos transportadores de glicose (GLUT-4) nos adipócitos e redução da internalização da insulina nas células endoteliais (SILVA, 2011).

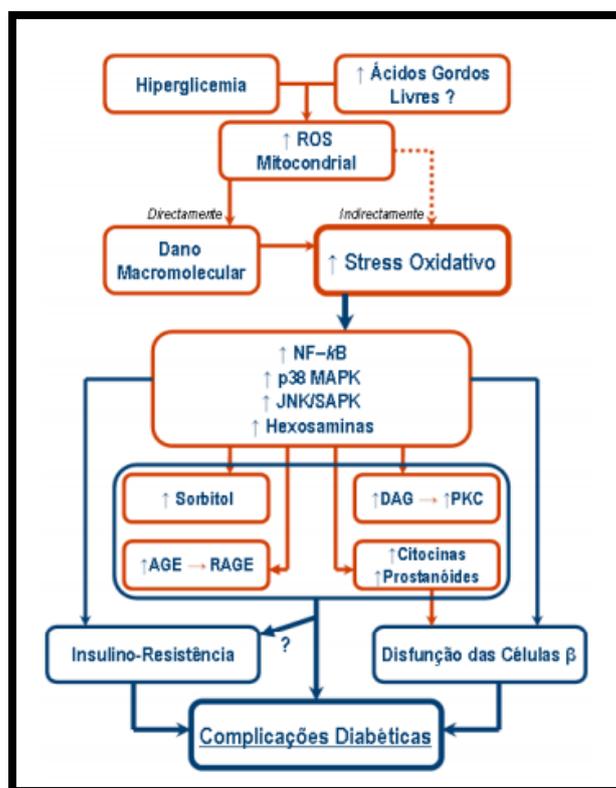
Outros alvos da hiperglicemia e dos EROS são: a cascata de sinalização que envolve o fator de transcrição NF- κ B, o qual participa das respostas imunes e inflamatórias, bem como na apoptose. Este fator nuclear é responsável pela regulação da expressão de um grande número de genes, incluindo os ligados às complicações do diabetes e outros genes que participam de um grande número de processos celulares envolvidos na inflamação, imunidade, crescimento celular, apoptose e respostas teciduais específicas ao estresse (LOPES *et al.*, 2008).

A sobrecarga de glicose pode ativar muitas vias metabólicas ou de sinalização que não só tentam alienar glicose excessiva, mas também geram mais espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e mais insuficiência das células β . As vias incluem aumento do NADH/NAD⁺, ativação de proteína quinase C e ativação da via do

poliál resultando no acúmulo de sorbitol e frutose, formação de produtos avançados de glicação e estresse do retículo endoplasmático. O estabelecimento de todas estas vias culmina na produção de espécies reativas de oxigênio e geração de mais estresse oxidativo (WU; YAN, 2015).

Alguns dos mecanismos supostos para a fisiopatologia do diabetes através da formação de EROs e na ativação de numerosas vias celulares sensíveis ao estresse então dispostos na figura 2.

Figura 2. Fisiopatologia da disfunção das células β e insulino-resistência no DM2, devido ao Estresse oxidativo.



Fonte: Lopes *et al.* (2008)

1.1.6 Tratamento do diabetes

O tratamento da hiperglicemia visa à resolução dos sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso, em curto prazo, e à prevenção de complicações crônicas e morte associada ao diabetes, em longo prazo (WEINERT *et al.*, 2010). O objetivo principal é trazer os níveis de glicose sanguíneos elevados para uma gama normal, tanto para melhorar os sintomas do diabetes, como para prevenir ou retardar suas

complicações. A realização deste objetivo exige uma abordagem coordenada, sistemática e abrangente, centrada no paciente por parte do sistema de saúde (OMS, 2015).

O principal meio de redução da glicemia é pela intervenção intensiva no estilo de vida, com controle alimentar associado aos exercícios físicos. Porém, os medicamentos antidiabéticos devem ser empregados quando não se tiver atingido os níveis glicêmicos desejáveis após estas intervenções (SBD, 2015). A terapêutica tradicional inicia o manejo com monoterapia e realiza o acompanhamento com aumento da dose até a máxima efetiva, para então adicionar uma segunda medicação (WEINERT *et al.*, 2010; FOROUHI; WAREHAM, 2014).

Também é importante reconhecer que apesar da intervenção (farmacológica, assim como a modificação do estilo de vida), as concentrações de glicose aumentam ao longo do tempo em pessoas com DM2, presumivelmente devido a uma diminuição da capacidade de secreção de insulina que exige intervenção adicional todo o tempo (SMUSHKIN; VELLA, 2010).

Atualmente terapias disponíveis para o DM2 incluem insulina e vários medicamentos anti-diabéticos orais, tais como sulfonilureias, biguanidas, glinidas, inibidores α -glicosidase, e tiazolidinedionas. No entanto, foi visto que tais terapias têm tanto eficácia limitada como efeitos colaterais significativos tais como hipoglicemia, flatulência, ganho de peso e aumento de problemas gastrointestinais (LEE; JEON, 2013). O uso de agentes orais levou a sugestão de que a farmacoterapia precoce pode prevenir as complicações do diabetes ou induzir a sua remissão (SMUSHKIN; VELLA, 2010).

A metformina é o principal representante da classe das biguanidas disponível atualmente e é a droga mais utilizada na condição do DM2, sendo indicada no início do tratamento, pois possui boa eficácia e segurança, além de possuir baixo custo. Tal droga atua através da atividade intracelular do monofosfato de adenosina-quinase produzindo redução da resistência à insulina no fígado, tecido adiposo e outros tecidos periféricos, com conseqüente inibição da gliconeogênese hepática. Assim, seu principal efeito ocorre sobre a glicemia de jejum, sem acarretar hipoglicemia. Outra vantagem é que não há ganho de peso, podendo até mesmo reduzi-lo. Desta forma, recomenda-se a utilização de metformina em todos os pacientes com DM2 na ausência de contra-indicações. Os principais efeitos colaterais incluem náusea, diarreia e dor abdominal acometendo até um terço dos pacientes. As sulfoniluréis são a segunda opção

(SGARBI, VILLAR, 2004; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009; WEINERT *et al.*, 2010).

No quadro 2 pode-se observar os diferentes tratamentos por via oral para o DM2, com seus respectivos mecanismos de ação.

Alguns portadores de DM2 irão necessitar de terapia insulínica, quando, no momento do diagnóstico, os níveis de glicose plasmática estiverem muito elevados (270 a 300 mg/dL) e quando os medicamentos orais não conseguirem manter os níveis glicêmicos dentro dos limites desejáveis (SBD, 2015).

Quadro 2: Medicamentos antidiabéticos: mecanismo de ação e efeito clínico.				
Classes de mediações	Princípios ativos	Mecanismo De ação	Redução da glicemia de jejum (mg/dl)	Efeito sobre o peso corporal
Sulfoniluréias	clorpropamida, glibenclamida, glipizida, gliclazida e glimepirida	Aumento da secreção de insulina	60 – 70	Aumento
Biguanidas	Metformina	Aumento da sensibilidade à insulina predominantemente no fígado	60 –70	Diminuição
Inibidores da alfa-glicosidase	Acarbose	Retardo da absorção de carboidratos	20 – 30	Sem efeito
Tiazolidinedionas	troglitazona, rosiglitazona, e pioglitazona	Aumento da sensibilidade à insulina no músculo	35 – 40	Aumento
Glinidas	Repaglinida Nateglinida	Secretagogo de insulina	35- 40	Aumento

Fonte: Adaptado de (SGARBI; VILLAR, 2004; WEINERT *et al.*, 2010; SBD, 2015).

Para as pessoas que vivem com diabetes, o acesso ao tratamento a preços acessíveis, incluindo a insulina, é fundamental para a sua sobrevivência (OMS, 2015).

Nos doentes portadores de DM2, a hiperglicemia crônica parece ser uma das principais causas de dano celular β , associado com dano causado por estresse oxidativo. E o risco de complicações está associado a estes danos. Logo, qualquer redução nos

níveis de glicose sanguínea, promove diminuição nos riscos de complicações (LOPES *et al.*, 2008; WEINERT *et al.*, 2010).

O uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do diabetes antes do advento dos hipoglicemiantes orais, pois são importantes fontes de substâncias potencialmente terapêuticas. Alguns de seus princípios ativos agem: aumentando a liberação de insulina, modificando o metabolismo glicêmico, inibindo fatores hiperglicemiantes e alterando a síntese de enzimas ou da glicose (DORNAS *et al.*, 2009). Portanto, a utilização de fármacos com potencial hipoglicemiantes e antioxidantes na prevenção da disfunção pancreática é de grande interesse no tratamento destes pacientes.

1.2 Diabetes induzido

A estreptozotocina (STZ) é um produto químico largamente utilizado para a indução de diabetes experimental em roedores. Desde o relatório inicial das suas propriedades diabetogênicas em 1963, STZ foi usado sozinho, em combinação com outros produtos químicos ou com manipulações dietéticas para indução de diabetes tipo 1 ou tipo 2 (WU, YAN; 2015).

A STZ é um derivado da nitrosouréia isolado de *Achromogenes streptomyces* com atividade antibiótica sob bactérias Gram-positivas e negativas, possuindo também efeito antineoplásico e de indução DM em roedores recém-nascidos não predispostos, destruindo suas células β . Trata-se de um poderoso agente alquilante que interfere no transporte de glicose e função glicoquinase e induz vários pontos de interrupção dupla hélice DNA (ARIAS-DÍAZ; BALIBREA, 2007).

A STZ decompõe espontaneamente o DNA, liberando íons carbono e alquilando a base guanina e componentes importantes geradores de ATP, como as enzimas glicolíticas ou mitocondriais, causando diminuição na síntese de NAD (dinucleotídeo adenina nicotinamida) (LE DOUX, 2008). STZ se acumula preferencialmente nas células β pancreáticas, através do GLUT2, onde provoca a morte celular β (LENZEL, 2008). Logo, é altamente seletiva para célula β pancreática e desde então ela tem sido utilizada para produzir diabetes experimental em animais, principalmente o DM1, em ratos, porcos da Índia, camundongos, macacos, e cães. Coelhos se mostraram resistentes à ação diabetogênica da STZ (SATO *et al.*, 2006).

Porém, foi observado que a nicotinamida, uma vitamina hidrossolúvel do grupo B, precursora da NAD, oferece proteção às células β pancreáticas contra grande variedade de insultos tóxicos ou imune mediados (DULIN *et al.*, 1969). Então, quando se realiza a administração de baixa doses de STZ e nicotinamida há indução de DM2 em roedores, e não DM1, pois ela inibe a ação da poli (ADP-ribose) sintase, levando a uma homeostase nos níveis de NAD intracelular, e protegendo as células pancreáticas (UCHIGATA *et al.*, 1983).

De acordo com Masiello *et al.* (1998), a nicotinamida protege contra toxicidade celular- β induzida por STZ, por meio de prevenir a apoptose e aumentar a regeneração celular β . Os autores demonstraram que na dose de 230 mg/kg, administrado intraperitonealmente 15 minutos antes da administração de STZ (60 mg/kg IV), produziu um número máximo de animais com hiperglicemia moderada estável e 40% de preservação das células de insulina pancreática.

A STZ não causa dano em outros tecidos do organismo, pois ela altera especificamente o DNA da célula β , com isso mostra ser mais eficaz para indução do modelo de diabetes experimental (LENZEL, 2008).

Outro modelo de indução do diabetes utiliza o aloxano, um derivado da pirimidina, que é uma toxina muito seletiva das células β -pancreáticas e possui, comprovadamente, ação seletiva e destrutiva sobre as células β pancreáticas, induzindo diabetes *mellitus*. Alguns estudos demonstraram que a formação de radicais superóxido e hidroxila, induzidos por aloxano, é responsável pela citotoxicidade desse composto. Outros experimentos sugerem que a inibição da secreção de insulina por aloxano é causada por sua interferência com as proteínas citoplasmáticas.

Estudo, utilizando o método imunistoquímico, observou que os pâncreas dos animais com diabetes *mellitus*, induzido por aloxano, apresentaram redução de 70% da área da ilhota ocupada pelas células beta, chegando até a ausência delas (LIMA *et al.*, 2001).

Porém, há muitos problemas devido à sua instabilidade química, metabolismo rápido e alguns fatores nos animais que podem interferir no seu metabolismo, tornando quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxano e sua concentração efetiva no pâncreas (NEGRI, 2005). Portanto, a STZ é uma droga preferível para indução do DM em modelos animais.

1.3 Lectinas

1.3.1 Breve histórico e classificação

Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam de forma específica e reversível a epítopos de carboidratos estruturais sem modificá-los (BIES *et al.*, 2004).

As pesquisas com lectinas começaram com Stilmark em 1888, que detectou proteínas tóxicas retiradas da mamona (*Ricinus communis* L.) capazes de aglutinar eritrócitos (*apud* SHARON; LIS, 1972). Desde então foram descritas várias proteínas com propriedade de aglutinar células vermelhas e o termo hemaglutinina foi utilizado como nome comum para todas as substâncias que possuíam tal atividade. Porém, ao perceber-se que estas substâncias tinham propriedade de selecionar alguns tipos de eritrócitos específicos dentro do grupo ABO, elas foram denominadas lectinas, originado do latim *legere*, que significa capaz de escolher (SHARON; LIS, 1972; LAM; NG, 2011).

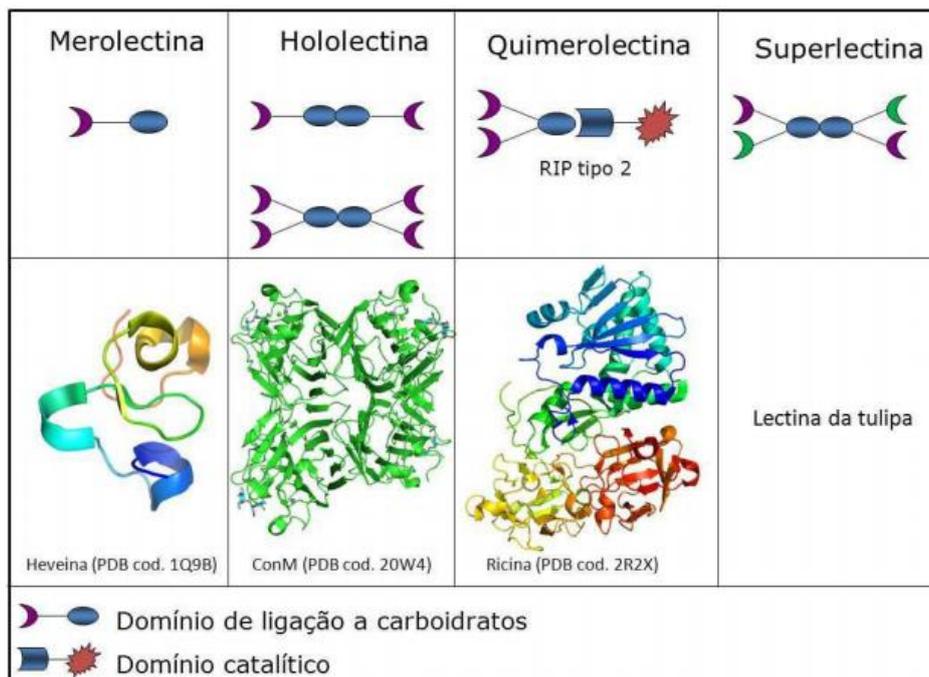
Em 1919, com a melhoria das técnicas de isolamento de proteínas, Sumner purificou a primeira lectina a partir de sementes de *Canavalia ensiformis*, que foi denominada concanavalina A (ConA) (SUMNER, 1919).

Atualmente, com sua melhor caracterização e definição, sabe-se que tais proteínas são responsáveis por decifrar glicocódigos, por meio de interações de superfície complexa e desempenham um papel central em um número considerável de funções e atividades biológicas (MURPHY, 2013).

As lectinas estão presentes em todos os reinos, podendo ser isoladas até mesmo em microrganismos, sendo que lectinas encontradas em animais são mais frequentemente associadas com as interações celulares, enquanto lectinas de plantas são conhecidas por apresentarem função de defesa contra predadores ou potenciais agentes patogênicos (YAU *et al.*, 2015).

Com base na sua estrutura, elas podem ser classificadas em quatro tipos principais, de acordo com a figura 3 (p. 31):

Figura 3: Classificação das lectinas de acordo com sua estrutura.



Fonte imagem: TEIXEIRA, 2012.

Merolectinas: são proteínas pequenas que possuem apenas um sítio de ligação a carboidrato, como resultado, não apresentam atividade aglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. Exemplos dessa classe são as proteínas tipo heveína, extraída do látex de *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991; VAN DAMME *et al.*, 1998);

Hololectinas: possuem dois ou mais sítios de ligações a carboidratos, logo, são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas pertencentes a essa classe está representada pelas lectinas de plantas, conhecidas como fitohemaglutininas (PEUMANS; VAN DAMME, 1994);

Quimerolectinas: além dos sítios de ligação a carboidratos, elas possuem outro sítio de ligação que apresentam atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que age independentemente dos domínios ligantes a carboidratos. Como representantes dessa classe, podem ser citadas as RIPs (Proteínas inativadoras de ribossomos) tipo 2 (VAN DAMME *et al.*, 1998);

Superlectinas: Possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os quais são estruturalmente diferentes e reconhecem açúcares não relacionados. A lectina de tulipa TxLC (*first Tulipa hybrid lectin with complex specificity*), é um exemplo desse grupo (VAN DAMME *et al.*, 1998).

As lectinas extraídas de algas marinhas foram primeiramente estudadas em 1966 por Boyd *et al.*, que perceberam atividade hemaglutinante de 21 tipos de algas da região de Porto Rico. Desde então, tem surgido vários estudos que comprovam atividade hemaglutinante de algas marinhas em todo o mundo (SAMPAIO *et al.*, 1993). Ainouz e Sampaio (1991) testaram atividade aglutinante de 20 espécies de algas marinhas do litoral brasileiro, e destas se destacam a grande quantidade de algas vermelhas.

As lectinas são proteínas muito versáteis e têm muitas aplicações diretas na investigação biológica e biomédica (LAM; NG, 2011).

1.3.2 Lectinas de Algas Marinhas

As algas marinhas são parte importante da dieta de muitos países do Extremo Oriente há séculos, já no Ocidente elas são menos utilizadas, mas tem se difundido bastante. Estas algas foram classificadas com base na suas pigmentações em: marrom (Phaeophyta), vermelhas (Rhodophyta) e verdes (Chlorophyta) (NWOSU *et al.*, 2011). As algas marinhas são conhecidas por oferecer uma abundância de compostos bioativos com grande potencial biomédico e farmacêutico.

As algas estão sempre submetidas a rápidas variações de intensidade de luz e concentrações de O₂ e CO₂ ao longo da coluna de água e, assim, sua sobrevivência depende de uma resposta eficiente ao estresse oxidativo. Por essa razão, esses organismos podem representar uma importante fonte de substâncias antioxidantes naturais (ROCHA *et al.*, 2007).

Em contraste com as lectinas de plantas terrestres, as lectinas de algas marinhas têm sido isoladas e caracterizadas em um ritmo muito mais lento. Além disso, informações bioquímicas e estruturais sobre lectinas de algas ainda são escassas (NAGANO *et al.*, 2005).

As lectinas de algas vermelhas possuem baixo peso molecular e seus pontos isoelétricos são dentro do intervalo 4,0-6,0. A maior parte delas, por exemplo lectinas isoladas a partir das algas vermelhas *Carpopeltis flabellata*, *Solieria robusta*, *Bryothamnion seaforthii*, *B. triquetrum*, *Pterocladia capillacea*, *G. ornata*, e *G. córnea* são proteínas monoméricas com alta teor de aminoácidos ácidos e não requerem a presença de cátions bivalentes para expor a sua atividade biológica. Estas lectinas não se ligam a monossacarídeos, e a sua atividade é inibida por oligossacarídeos complexos e/ou glicoproteínas (NASCIMENTO, 2014).

Aplicações biológicas das lectinas de algas marinhas merecem especial interesse, pois estas lectinas são proteínas de peso molecular menor do que lectinas vegetais. Assim, espera-se que as mesmas sejam menos antigênicas do que outras lectinas de plantas terrestres. Além disso, as lectinas de algas marinhas parecem expressar as suas atividades biológicas de uma forma mais intensa do que as lectinas provenientes de outras fontes, além de possuírem grande estabilidade molecular devido à presença de pontes dissulfeto e alta especificidade para carboidratos complexos e glicoconjugados (NAGANO *et al.*, 2005).

As lectinas do gênero *Bryothamnium* pertencem ao filo Rhodophyta e são encontradas no mar do caribe, ao longo da costa da América do Sul e no Oceano Atlântico, possuindo duas lectinas isoladas a partir das espécies *B. seaforthii* e *B. triquetrum* (BSL e BTL). Tais lectinas aglutinam todos os tipos sanguíneos, são inibidas por fetuína e mucina e não são dependentes de cátions de metais divalentes. As duas possuem um total de 91 aminoácidos, com 11 diferenças entre si. Possuem massa bem parecida, com BTL apresentando $8980,1 \pm 2$ Da e BSL com $9090,4 \pm 2$ Da, com duas pontes dissulfeto, cada (MEDINA-RAMIREZ *et al.*, 2007). Ambas possuem elevada resistência ao aumento de temperatura (AINOUZ *et al.*, 1995).

BSL é observada em SDS-PAGE como uma banda larga com uma massa molecular aparente de 9 kDa na presença e na ausência de β -mercaptoetanol. A análise por espectrometria de massa revelou que BSL contém uma mistura de cinco isoformas, nomeadas de: BSL1, BSL2, BSL3, BSL4 e BSL5. Tais isoformas são polipeptídeos composto por 91 resíduos de aminoácidos, incluindo 4 cisteínas (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012).

1.3.3 Atividades biológicas de lectinas de algas marinhas

Devido à sua propriedade peculiar de ligação à carboidratos e do papel intrínseco destes na comunicação celular, as lectinas apresentam uma variedade de efeitos biológicos, alguns dos quais servindo como base para a sua aplicação na investigação de atividades químicas e biológicas (MACEDO *et al.*, 2015).

Algumas lectinas de algas marinhas exibem uma atividade significativa contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outros vírus envelopados, como é o caso da lectina isolada da alga marinha *Griffithsia* spp (CHERNIKOV *et al.*, 2013). Além disso, lectinas de algas marinhas demonstram efeito indutor de apoptose em células

cancerígenas bem caracterizados, como é o caso da lectina de *Haliotis discus discus*, que pode ativar caspases, desencadeando assim, a apoptose em linhagens de células cancerígenas de cólon, pulmão e fígado (YAU *et al.*, 2015). Outra lectina isolada da alga marinha vermelha *Eucheuma serra*, mostrou atividade supressora no desenvolvimento de câncer de cólon em camundongos (FUKUDA *et al.*, 2006).

As lectinas de algas marinhas também possuem a atividade de agir como cicatrizantes (NASCIMENTO-NETO *et al.*, 2012), de induzir migração de neutrófilos (NEVES *et al.*, 2001), induzir a atividade linfocitária (LIMA *et al.*, 1998) e atuar como moléculas antinociceptivas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Podem atuar como molécula antibacteriana e antifúngica, com inibição da formação de biofilmes (TEIXEIRA *et al.*, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2014).

Estudos realizados com a lectina de alga vermelha BTL demonstrou atividades antioxidantes, agindo sobre os tecidos hepáticos e pancreáticos, atuando também na diminuição da hiperglicemia e hiperlipidemia (ALVES, 2015). A mesma lectina também demonstrou atividade antinoceptiva (VIEIRA *et al.*, 2004).

Estudos realizados com BTL e BSL mostraram que estas lectinas reconhecem variantes de células cancerígenas de cólon humano, e este reconhecimento pode ser devido à expressão de glicoreceptores nas membranas das células cancerígenas (PINTO *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O diabetes é um grave problema de saúde pública, que atinge grande parte da população. Em sua maioria os pacientes são diabéticos tipo 2, associado, geralmente, com o hábito de vida da população. O DM2 causa complicações tardias graves, tais como: retinopatias, nefropatias, alterações hormonais, metabólicas e vasculares, contribuindo para aumento das doenças cardiovasculares, que são a primeira causa de morte no mundo.

Esta patologia possui tratamento farmacológico bem estabelecido. Contudo, a adesão a este tratamento por parte dos pacientes tem sido dificultada devido aos efeitos adversos em longo prazo, associados à cronicidade da doença e à difícil mudança nos estilos de vida da população. Adjunto a essa questão, tem-se também o elevado custo e, às vezes, o difícil acesso a tais tratamentos.

É visto, portanto, a complexidade do DM2 e os problemas decorrentes do seu tratamento. Desta forma, são necessários mais estudos para fornecer terapias alternativas para tratamento do diabetes, que possuam um custo-benefício melhor para o paciente.

As algas marinhas vêm despertando crescente interesse na área da saúde por demonstrarem inúmeras atividades e funções biológicas. A sua acessibilidade e seu possível cultivo em grande volume são pontos positivos para obtenção de fármacos. Os estudos sobre as lectinas de algas marinhas obtiveram grande avanço em relação a sua caracterização e propriedades, porém informações adicionais são necessárias para uma maior compreensão das atividades exercidas por tais substâncias.

Dado o exposto, o estudo de uma substância proveniente de um produto natural como lectinas isoladas de algas marinhas, pode servir como um recurso terapêutico para complementar o tratamento do DM2, podendo contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antihiperglicêmica e antioxidante da lectina de *Bryothamnion seaforthii* em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina.

3.2 Específicos

- a) Induzir diabetes experimental com estreptozotocina em ratos Wistar;
- b) Avaliar a atividade antihiperglicêmica e antilípídica de BSL;
- c) Avaliar a ação antioxidante de BSL;
- d) Avaliar o efeito de BSL na resistência causada por diabetes em ratos Wistar;
- e) Avaliação histopatológica do pâncreas e fígado;

4 MÉTODOS

4.1 Lectina

Amostras da alga marinha vermelha *B. seaforthii* foram coletadas na costa nordeste do Brasil (praia Pacheco, Ceará). O material foi purificado a partir de epífitas e armazenado a -20 ° C até ser utilizado. A purificação da BSL foi realizada de acordo com o método do Ainouz *et al.* (1995).

4.2 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar (n=30) entre 8 e 10 semanas de vida, machos pesando aproximadamente 300 g, cedidos pelo Biotério Central – UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, de acordo com seu grupo, na hospedaria para animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Porangabussu, durante os procedimentos experimentais, permanecendo em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 25±2 °C e umidade 55±10%) com fornecimento de água e ração específica à vontade, exceto nos dias anteriores aos procedimentos, onde foi necessário jejum. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em Pesquisa animal/CEPA – UFC, sob o número de protocolo 121/14.

4.3 Indução do Diabetes por Estreptozotocina (STZ)

O diabetes foi induzido baseado no protocolo de Da Delfino *et al.* (2002), onde foi realizada proteção celular por meio da administração intraperitoneal de Nicotinamida na dose de 230 mg/kg, seguida por administração de estreptozotocina (Sigma® S-130) por via intraperitoneal na dose de 60 mg/kg de peso corporal, diluído em tampão citrato (0,1M pH 4,5). Este modelo provoca diabetes por um longo período de tempo chegando até 40 semanas. Após 3 dias da indução, a glicose sérica foi aferida por obtenção de sangue da veia caudal e analisada com o glicosímetro Accu-Chek Active (Roche®). Animais com níveis de glicose superiores a 200 mg/dL de glicose foram considerados diabéticos.

4.4 Tratamento

Antes do início do tratamento, os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (n= 6), de acordo com o tratamento/tipo solução aplicada: 1. Solução de cloreto de sódio (NaCl 0,15M); 2. Metformina 600 µg/kg; 3. Lectina de *Bryothamnion seaforthii* (BSL) 600 µg/kg; 4. BSL 300 µg/kg; 5. BSL 150 µg/kg. Todas as soluções utilizadas para tratamento foram diluídas em veículo líquido, NaCl 0,15M, também utilizado como grupo controle negativo, em respeito a isotonicidade fisiológica celular dos animais. A metformina foi utilizada como grupo controle positivo, pois é a droga de primeira escolha para o tratamento do diabetes. Os animais foram tratados diariamente no mesmo horário de acordo com os grupos abaixo (Tabela 1), por método de gavagem, com uso de uma sonda para introdução do líquido no estômago dos animais.

Tabela 1: Tratamentos utilizados nos grupos experimentais

Grupo	Tratamento	Nº de animais	Dose diária
01	NaCl 0,15M	06	100 µL
02	Metformina 600 µg/kg	06	100 µL
03	BSL 600 µg/kg	06	100 µL
04	BSL 300 µg/kg	06	100 µL
05	BSL 150 µg/kg	06	100 µL

Fonte: elaborada pelo autor

4.5 Testes bioquímicos

As coletas do sangue foram realizadas nos dias 0, 30, 60, 90 e 120 após a confirmação da hiperglicemia através de punção da veia da cauda do animal utilizando seringa de 1 mL heparinizada e tubo com ativador de coágulo. Para obtenção do soro, a amostra foi centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos, sendo acondicionado sob refrigeração e transportado para análise. Foram analisados os parâmetros séricos de glicose, triglicérides e colesterol total na automação Konelab 600i (WienerLab®) com seus respectivos kits. A partir da lise eritrocitária foram analisadas as enzimas glutatina peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Os métodos HOMA-β e HOMA-IR foram calculados por automação.

4.5.1 Glutathione peroxidase (GPx)

A atividade Glutathione peroxidase (GPx) foi determinada em eritrócitos utilizando o Kit RANSEL® (Randox Laboratories, Reino Unido), de acordo com o método descrito por Paglia e Valentine (1967). A atividade da GPx foi expresso como UI/mg de proteína.

4.5.2 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) foi medida em eritrócitos utilizando o Kit RANSOD® (Randox Laboratories, Reino Unido). Este método emprega xantina e xantina oxidase para produzir radicais superóxido que reagem com o ácido 2- (4 - iodofenil) -3- (4 - nitrofenil) -5- cloreto de feniltetrazol (INT) para formar o composto de formazan vermelho (McCord & Fridovich, 1969). A atividade superóxido dismutase foi medida pelo grau de inibição desta reação a 505nm. A atividade de SOD foi expressa em IU/mg de proteína.

4.5.3 Catalase (CAT)

A atividade da enzima foi medida através do método descrito por Aebi (1984). Eritrócitos foram hemolisados pela adição de 100 volumes de água destilada e, em seguida, 20µl desta amostra de hemolisado foi adicionado a uma cubeta e a reação foi iniciada pela adição de 100 µL de H₂O₂ a 300 mM recentemente preparada em tampão fosfato (50 mM, pH 7,0 para dar um volume final de 1 mL). A taxa de decomposição de H₂O₂ foi medida em espectrofotômetro a 240 nm durante 120 segundos. A atividade de CAT foi expressa como UI/mg de proteína.

4.5.4 HOMA-IR

O método de *homeostasis model assessment for insulin resistance* (HOMA-IR), foi proposto por Matthews *et al.* em 1985. Tal modelo prediz o nível de resistência à insulina de acordo com a glicemia e a insulinemia basal. O teste é calculado pela fórmula $[(\text{FPI } \mu\text{U/ml} \times \text{FPG mmol/l}) / 22,5]$, onde: FPI - insulina no plasma em jejum, FPG – glicose no plasma em jejum e 22,5 foi o valor de resistência descrito como porcentagem da população de referência.

4.5.5 HOMA β

O método de *homeostasis model assessment β -cell function* (HOMA β) tem por finalidade determinar a capacidade funcional das células beta pancreáticas. O teste é calculado pela fórmula $(20 \times \text{FPI } \mu\text{U/ml} / \text{FPG mmol/l} - 3,5)$, onde: FPI - insulina no plasma em jejum, FPG – glicose no plasma em jejum.

4.6 Avaliação Histopatológica

Para esta análise, no último dia do experimento, os animais foram sedados, anestesiados e sacrificados para excisão do pâncreas e fígado. Os órgãos foram fixados em formaldeído 10% v/v preparado em tampão PBS 0,01 M, pH 7,2. Estas amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e incluídas em parafina. Após microtomia, os cortes feitos em secções de 4 μm foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) (MICHALANY, 1991).

4.7 Análise estatística

Para a avaliação dos dados obtidos através das análises bioquímicas, utilizou-se o teste de análise de variância (one-way ANOVA) com o pós-teste de Tukey presentes no pacote estatístico GraphPad Prism® versão 6.00 para Microsoft Windows®, considerando estatisticamente significante os resultados que apresentaram $p < 0,05$.

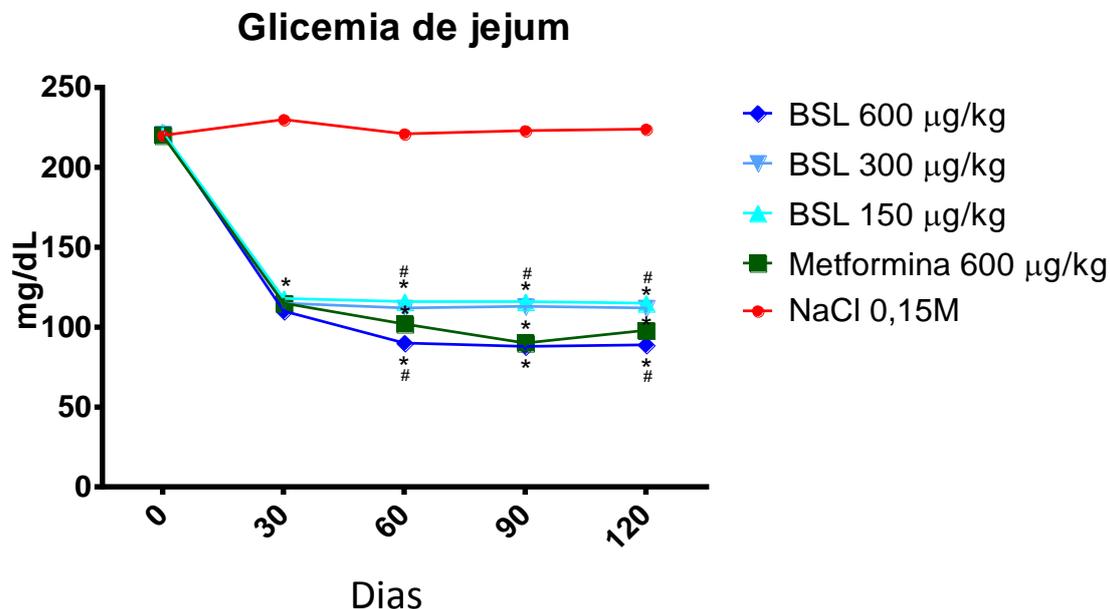
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos grupos em que foi administrada a BSL, observou-se uma redução significativa dos níveis séricos de glicose durante todos os dias de avaliação quando comparado ao controle negativo (figura 4, pág. 45). Na primeira coleta (dia 0), observou-se que os níveis de glicose de jejum, dos animais em todos os grupos são maiores do que 200 mg/dL, o que os classificam como diabéticos, seguindo o mesmo padrão fornecido para humanos pela SBD (Sociedade brasileira de Diabetes). Na segunda coleta, depois de decorridos 30 dias do tratamento, observou-se redução significativa na concentração de glicose sanguínea dos grupos tratados com metformina 600 µg/kg e BSL em todas as concentrações, com uma diminuição para aproximadamente 100 mg/dL, sendo que BSL na concentração de 600 µg/kg obteve diferença significativa quando comparada a BSL na concentração de 150 µg/kg (dados não mostrados no gráfico).

Após 60 dias de tratamento (terceira coleta), os níveis de glicose continuam a reduzir nos demais grupos, enquanto no grupo controle negativo NaCl 0,15M continuam a aumentar. Também, nesta análise, pôde-se observar que BSL em suas três concentrações diminuiu significativamente os níveis de glicose, quando comparado ao controle positivo, metformina 600 µg/kg. Os valores seguem o mesmo padrão de redução após terem decorrido 90 dias de tratamento, observando-se que nesta coleta BSL 600 µg/kg não obteve diferença significativa quando comparado ao controle positivo, mesmo obtendo um efeito similar à droga-padrão. Nas duas coletas, BSL na concentração de 600 µg/kg obteve diferença significativa quando comparada às concentrações de 300 e 150 µg/kg (dados não mostrados no gráfico).

Decorridos 120 dias de tratamento, na última avaliação, volta-se a perceber a diferença entre BSL 600 µg/kg e o controle positivo, metformina 600 µg/kg e que a redução significativa em relação ao controle negativo se mantém. Ressaltando-se que, nesta avaliação, além da diferença entre BSL 600 µg/kg e as outras duas concentrações, BSL 300 µg/kg também mostrou diferença quando comparada à concentração de 150 µg/kg (dados não mostrados no gráfico). Isto sugere que BSL 600 µg/kg obtém resultados melhores do que as duas outras concentrações e que possui efeito equiparável e até melhor do que a droga padrão, podendo servir, futuramente, como opção de tratamento para o DM2.

Figura 4. Níveis de glicose em jejum de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborado pelo autor

Cavada *et al.* (2003) demonstraram que mudanças estruturais e de conformação das lectinas podem modular a sua capacidade em se ligar ao receptor de insulina e são responsáveis por sua distinta capacidade para desencadear a fosforilação do receptor. No estudo, as lectinas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea virgata*, *Dioclea rostrata* e *Cratylia floribunda* estimularam a fosforilação do receptor de insulina em um modo dose dependente, *in vitro*, em microsomas hepáticas.

Alves (2015), em trabalho realizado com a lectina de *Bryothamnion triquetrum* (BTL) estruturalmente semelhante à BSL, obteve resultados significativos de ação hipoglicemiante em ratos diabéticos induzido por STZ. No estudo, BTL na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, obteve resultado semelhante à glibenclamida, outra droga de escolha no tratamento do DM2. Esses resultados corroboram os achados no presente estudo, onde a BSL, em todas as concentrações, obteve resultados significantes quando comparados aos controles positivos e negativos, sendo que a BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou resultado melhor do que à metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Corroborando, também, os achados hipoglicemiantes de BSL neste estudo, tem-se que os trabalhos com a lectina da alga vermelha *Amansia multifida* obteve redução da glicose plasmática em animais diabéticos de até 60% (MESQUITA, 2003).

Em outro estudo realizado com fração protéica da alga vermelha *Digenea simplex*, houve redução significativa dos níveis de glicose plasmática entre 30 e 37%, em ratos diabéticos, induzido por aloxano (ANDRADE, 2006).

Ainda atestando os dados do presente estudo, o trabalho realizado com gel da alga vermelha *Gelidium amansii*, em ratos diabéticos induzidos por nicotinamida-estreptozotocina, modelo utilizado pelo presente trabalho, mostrou que houve redução significativa da concentração plasmática de glicose, colesterol total e triglicérides. Esses resultados foram até melhores quando comparados ao fármaco de escolha dos autores, pertencente ao grupo das Tiazolidinedionas, que possui ação de sensibilizar os receptores à insulina (YANG *et al.*, 2015). Estudo realizado por Shi *et al.* (2013), onde foi avaliada a atividade antihipoglicemiante do composto bromofenol isolado da alga vermelha *Rhodomela confervoides* em ratos modificados geneticamente, obteve resultados significativos e uma relação dose-dependente do composto. Dois outros bromofenóis isolados a partir da alga vermelha *Grateloupia elliptica* demonstraram atividade antidiabética por inibição α -glucosidase em ratos diabéticos (KIM *et al.*, 2008).

Embora a glicose seja o aspecto-chave do DM, um recurso muitas vezes esquecido é a relação entre o controle da glicose e do impacto sobre os lipídios. De fato, o DM é sempre combinado com hiperlipidemia (YANG *et al.*, 2015).

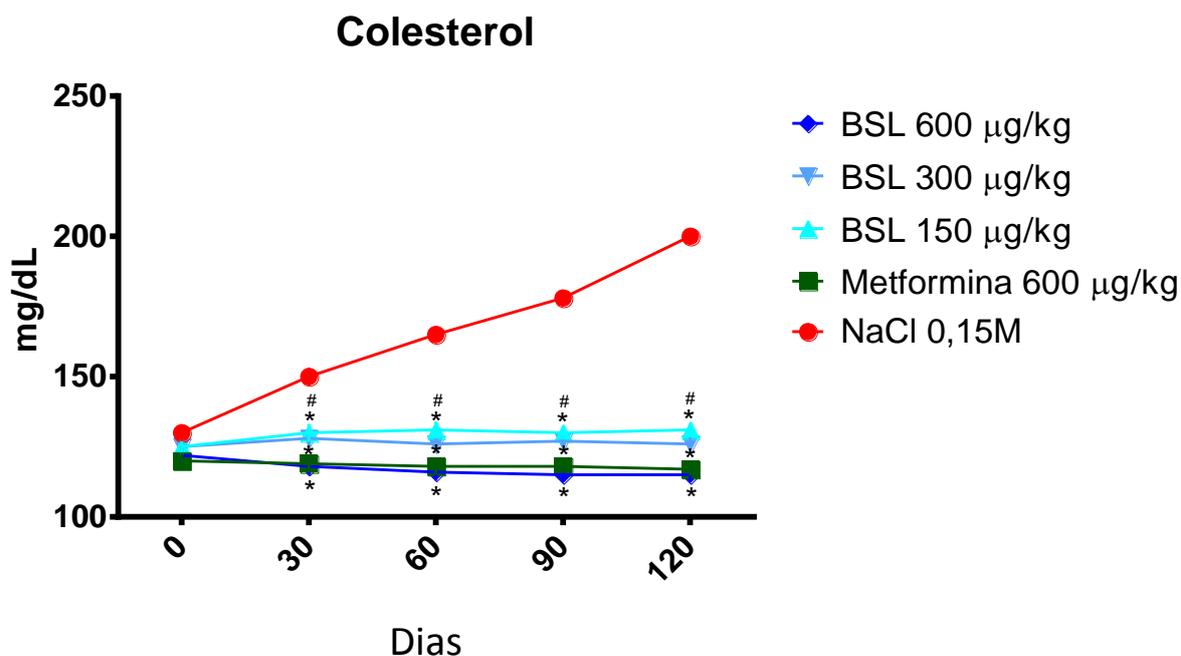
Dada a associação entre lipídio, resistência à insulina, DM e doenças cardiovasculares, o entendimento da fisiopatologia do desenvolvimento no diabetes, tanto na visão da glicose quanto na dos lipídios é indispensável para permitir a descoberta dos melhores alvos para a terapêutica do DM2 e suas comorbidades (ERION *et al.*, 2015).

Avaliando-se a figura 5 (p. 47), observa-se que na primeira coleta (dia 0), todos os grupos se encontram numa faixa de aproximadamente 120-130 mg/dL de colesterol. Porém, após 30 dias de tratamento (segunda coleta), todos os tratamentos com BSL reduziram significativamente em relação ao grupo controle negativo. Com a análise, observou-se também, que metformina 600 μ g/kg e BSL 600 μ g/kg obtiveram diferença significativa quando comparadas à BSL nas concentrações de 300 e 150 μ g/kg (dados

não mostrados no gráfico). Os valores seguem o mesmo padrão de redução após terem decorrido 60 e 90 dias de tratamento.

Na última avaliação, decorridos 120 dias do tratamento, os níveis de colesterol total continuam reduzindo significativamente nos grupos tratados com BSL e metformina, alcançando um total de aproximadamente 100 mg/dL. Enquanto o grupo tratado com NaCl alcança aproximadamente 200 mg/dL, o que mostra que a hiperglicemia é sempre associada com hiperlipidemias, pois há descompensação do metabolismo lipídico, uma vez que é instalada a resistência à insulina (GOMES NETO, 2009).

Figura 5. Níveis de colesterol total de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M) #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



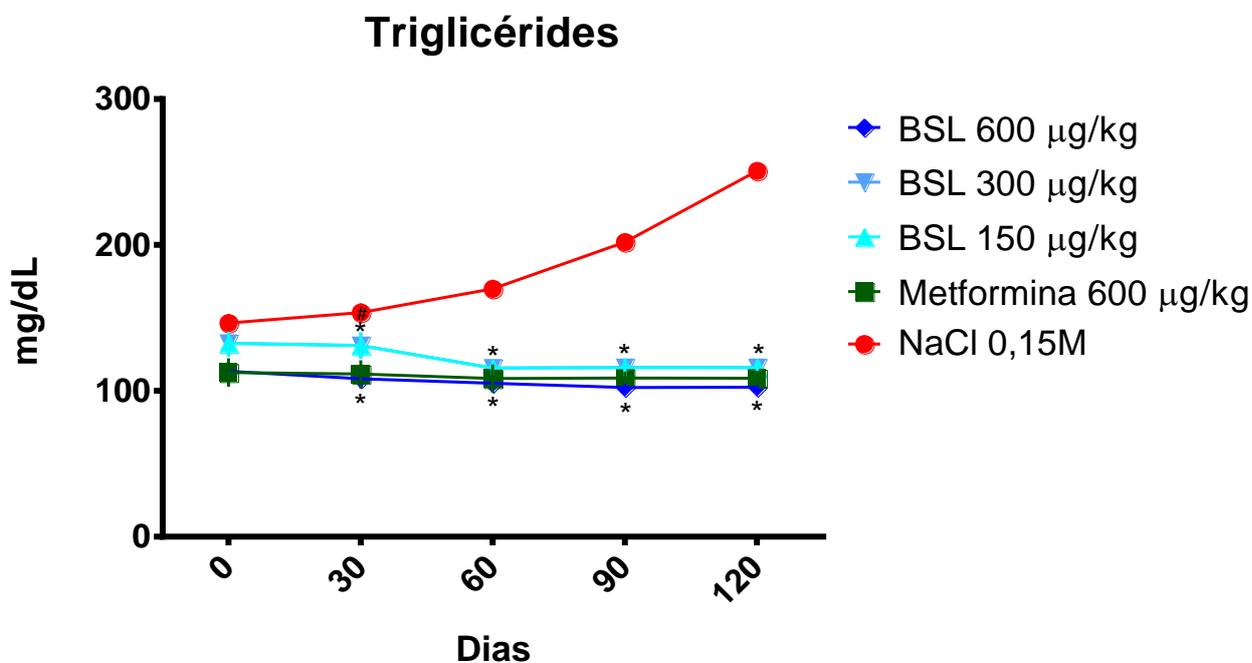
Fonte: elaborado pelo autor

No estudo realizado por Alves (2015), com BTL, em relação aos níveis de colesterol total, a lectina na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, obteve resultado significativo após 21 dias de tratamento, quando comparado ao controle positivo (glibenclamida 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

A hipertrigliceridemia é um dos distúrbios lipídicos mais comuns associados ao DM2, portanto a mensuração dos níveis séricos de triglicérides é um importante parâmetro para o acompanhamento de pacientes com tal doença.

Em relação aos níveis de triglicérides (figura 6), pode-se observar que na primeira coleta (dia 0) os níveis de triglicérides dos grupos tendem a se manter na faixa entre 100 e 150 mg/dL. Na segunda coleta, 30 dias após a indução, todos os grupos obtiveram redução significativa, quando comparado ao controle negativo NaCl 0,15 M.

Figura 6. Níveis de triglicérides de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M) #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborado pelo autor

Na terceira coleta após 60 dias de tratamento, todos os grupos obtiveram redução significativa quando comparados ao controle negativo, mas não houve diferenças entre os demais tratamentos. Porém, decorridos 90 e 120 dias de tratamento, a redução de triglicérides quando comparado ao controle negativo se manteve e houve diferença estatística entre a metformina e BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em relação aos grupos BSL 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dados não mostrados no gráfico). Isso pode indicar que BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ é comparável a metformina na redução sérica de triglicérides.

É importante notar que os níveis de triglicérides nos animais tratados com NaCl 0,15M tenderam a aumentar consistentemente a cada nova coleta, confirmando o aumento de dislipidemias quando a hiperglicemia é instalada.

Alves (2015) ao verificar os níveis de triglicérides em ratos diabéticos atestou que nos grupos tratados com BTL, obtiveram diminuição significativa em relação ao controle positivo desde a primeira semana de tratamento.

Foram observadas reduções significantes de armazenamento de triglicérides no tecido adiposo de ratos diabéticos, com a administração do extrato da alga vermelha *Gelidium amansii*. O autor relata que a atividade redutora de triglicérides pode ser devido à ação do extrato em aumentar hormônios regulatórios do metabolismo lipídico, como a adiponectina (YANG *et al.*, 2015). Em relação ao presente estudo, a provável explicação para a diminuição das hiperlipidemias no decorrer do tratamento, pode se dever a uma melhor compensação da glicose sanguínea nos grupos tratados com metformina e BSL, o que ocasiona uma menor lipólise no organismo.

Em outro estudo realizado com o extrato etanólico da alga vermelha *Gelidium amansii*, mesma alga do estudo anterior, o nível de acúmulo de lipídios foi significativamente diminuída de forma dose-dependente quando administrada uma concentração de 40 µg/ml nos grupos tratados com o extrato, obtendo uma redução de 75%, quando comparado ao grupo controle (SEO *et al.*, 2012).

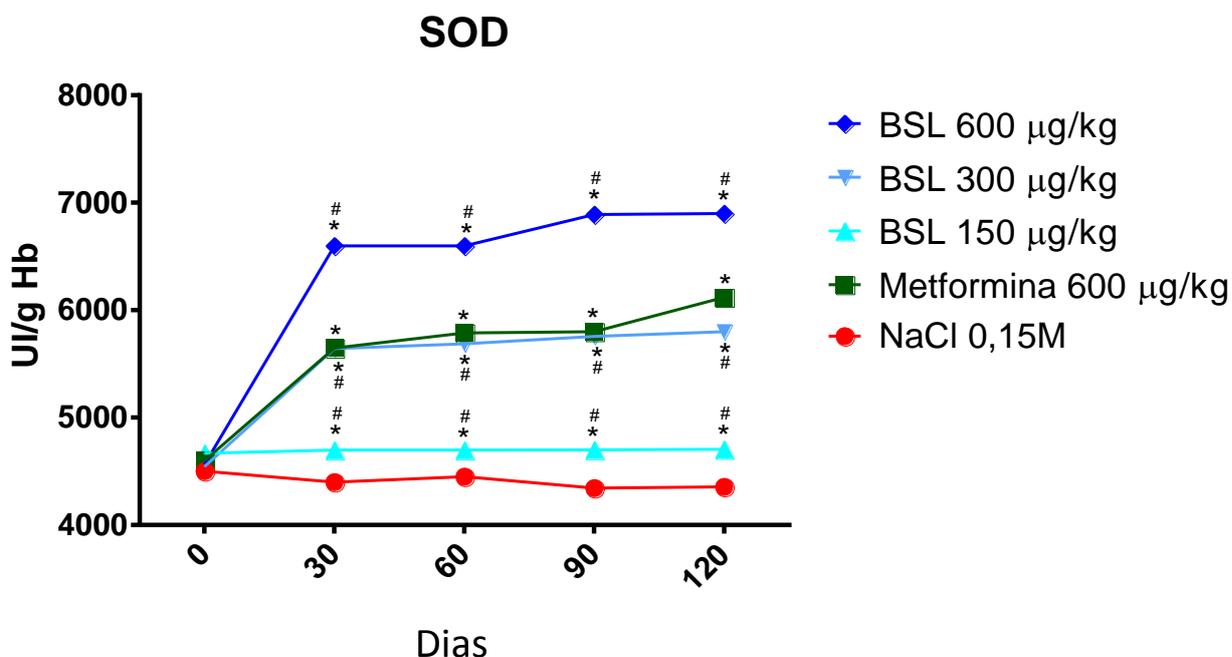
Shi *et al.* (2013), também testando o composto bromofenol da alga vermelha *Rhodomela confervoides* para redução de lipídios em ratos diabéticos, obtiveram resultados positivos e dose-dependente para colesterol total e triglicerídeos.

Existe um consenso de que o estresse oxidativo causado pela hiperglicemia e hiperlipidemia resultante do diabetes gera as principais complicações tardias do DM2 (HOUSTIS *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2008).

A determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) (figura 7, p. 50) mostrou que na primeira coleta a atividade da enzima permanece, praticamente, a mesma em todos os grupos tratados. Porém, nas coletas subsequentes, nos dias 30, 60, 90 e 120 dias, há aumento significativo na atividade enzimática nos grupos tratados com BSL nas três concentrações, quando comparados ao controle negativo NaCl 0,15M, e controle positivo, metformina 600 µg/kg. Também verificou-se que BSL 600 µg/kg obteve diferença significativa quando comparada a BSL 300 e 150 µg/kg, e BSL 300 também obteve diferença significativa em relação à BSL 150 µg/kg

(dados não mostrados no gráfico), indicando que há uma relação dose-dependente, neste caso.

Figura 7. Quantificação enzimática de superóxido dismutase em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborada pelo autor

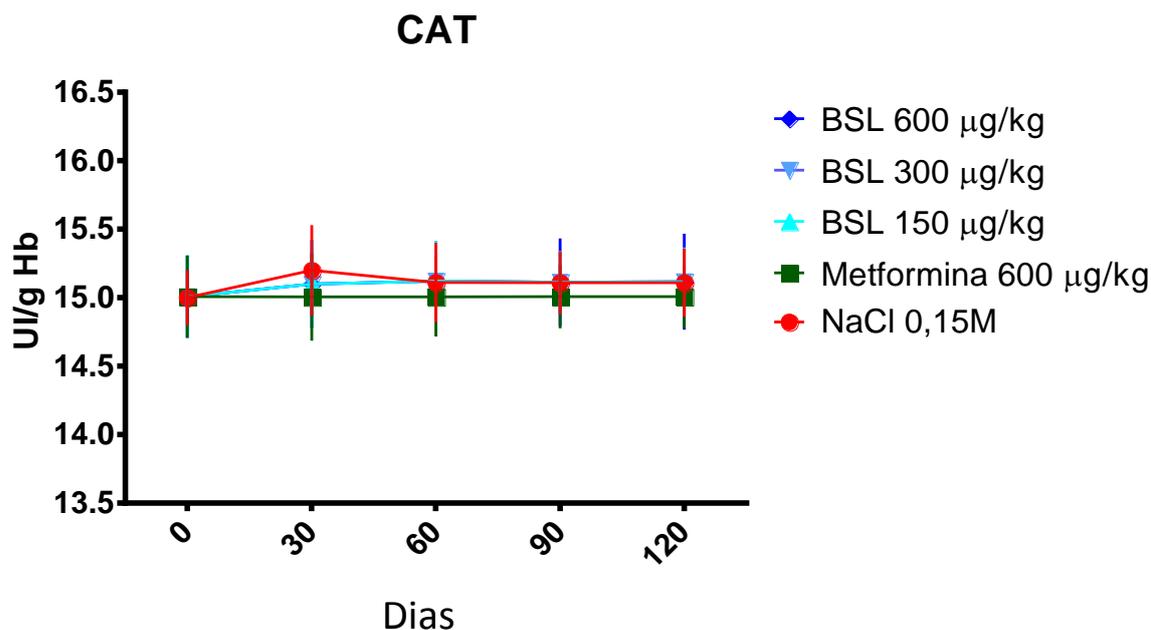
Alves (2015), ao avaliar os níveis de SOD em ratos diabéticos, mostrou que no grupo tratado com BTL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, os níveis da enzima aumentaram significativamente quando comparada aos outros grupos tratados, corroborando com os dados achados no presente estudo.

No estudo com o extrato etanólico da alga vermelha *Gelidium amansii*, observou-se que nas concentrações de 20 ou 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o extrato aumentou substancialmente os níveis de SOD em comparação com o grupo controle. O estudo mostrou que tal extrato suprime a produção de EROs, e protege as células contra o estresse oxidativo através da ativação destas enzimas antioxidantes (SEO *et al.*, 2012).

No que diz respeito à atividade enzimática da catalase (CAT) neste estudo, pode-se observar que não houve alterações significativas em nenhum dos grupos tratados, mesmo no grupo tratado com metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figura 8, p. 51).

Alves (2015), no estudo com BTL, mostrou que em relação à catalase, os níveis da enzima estavam aumentados no 7º dia de tratamento, porém, os níveis declinaram a partir do 14º dia de tratamento.

Figura 8. Quantificação enzimática de catalase em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);

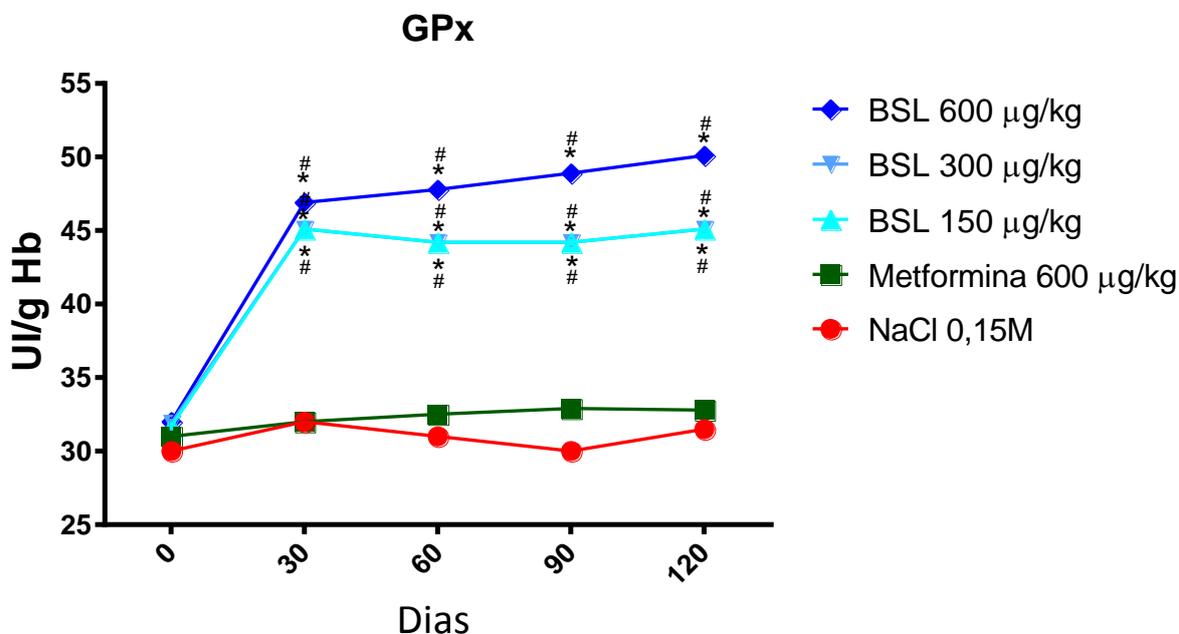


Fonte: elaborado pelo autor

Em relação aos níveis de glutathiona peroxidase (GPx) (figura 9, p.52), percebe-se que os níveis de atividade desta enzima permanecem similares em todos os grupos no primeiro dia de coleta (dia 0). Porém, ao analisar os resultados das coletas posteriores, (dia 30 e 60), pode-se perceber um aumento significativo da atividade enzimática nos grupos tratados com BSL nas três concentrações (600, 300, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) quando comparados ao controle negativo e também ao controle positivo.

Este aumento significativo tende a permanecer nas coletas subsequentes, após decorridos 90 e 120 dias de tratamento, ressaltando-se que BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obteve diferença significativa quando comparada as concentrações de 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (dados não mostrados no gráfico). Isto demonstra, mais uma vez, que BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ possui melhor atividade quando comparada à metformina e à suas duas outras concentrações.

Figura 9. Quantificação enzimática de glutathiona peroxidase em ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborado pelo autor

Ao testar a atividade enzimática de GPx, Alves (2015) observou-se que ao tratar os animais diabéticos com BTL, nas concentrações de 600 e 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$, houve aumento significativo da atividade enzimática, podendo ser comparada ao controle positivo utilizado no estudo (glibenclamida), corroborando os dados do presente estudo, onde BSL aumentou significativamente a atividade enzimática de GPx nos três grupos tratados.

Foi comprovado por Silva *et al.* (2011) que há uma aumento do estresse oxidativo, com o estabelecimento do DM2, o que pode contribuir para complicações dessa doença. No que diz respeito a este estudo, observou-se que os níveis de atividade de enzimas antioxidantes aumentaram significativamente nos grupos tratados com a lectina de *B. seaforthii*. Provavelmente, a lectina age aumentando a quantidade de enzimas antioxidantes, porém não se sabe ainda qual o mecanismo envolvido.

Estudo realizado com o extrato aquoso das algas marinhas vermelhas *Halimeda incrassata* e *Bryothamnion triquetrum*, mostrou que tais extratos possuem capacidade

antioxidante em células com estresse oxidativo gerado por MeHgCl (cloreto de metil mercúrio), protegendo as células de morte celular (FALLARERO *et al.*, 2003).

Estudo realizado por Vidal *et al.* (2006) também demonstrou atividade antioxidante do extrato da alga vermelha de *Bryothamnion triquetrum*. Uma desvantagem de se utilizar o extrato, é que não se sabe quais compostos da alga foram responsáveis por tal atividade, porém, nos estudos realizados por Alves (2015) com a lectina extraída de *B. triquetrum* (BTL), houve aumento importante da atividade antioxidante nos animais diabéticos induzidos por estreptozotocina. Isto pode indicar que os resultados antioxidantes dos extratos, podem ser devido à porção protéica da lectina.

Numerosos estudos demonstraram que os extratos de plantas ou fitoquímicos que têm propriedades antioxidantes podem melhorar a disfunção das células β no diabetes (WU; YAN, 2015). Este estudo poderá servir de guia futuro para investigações de novos medicamentos na área de distúrbios metabólicos como DM2, estresse oxidativo e dislipidemias.

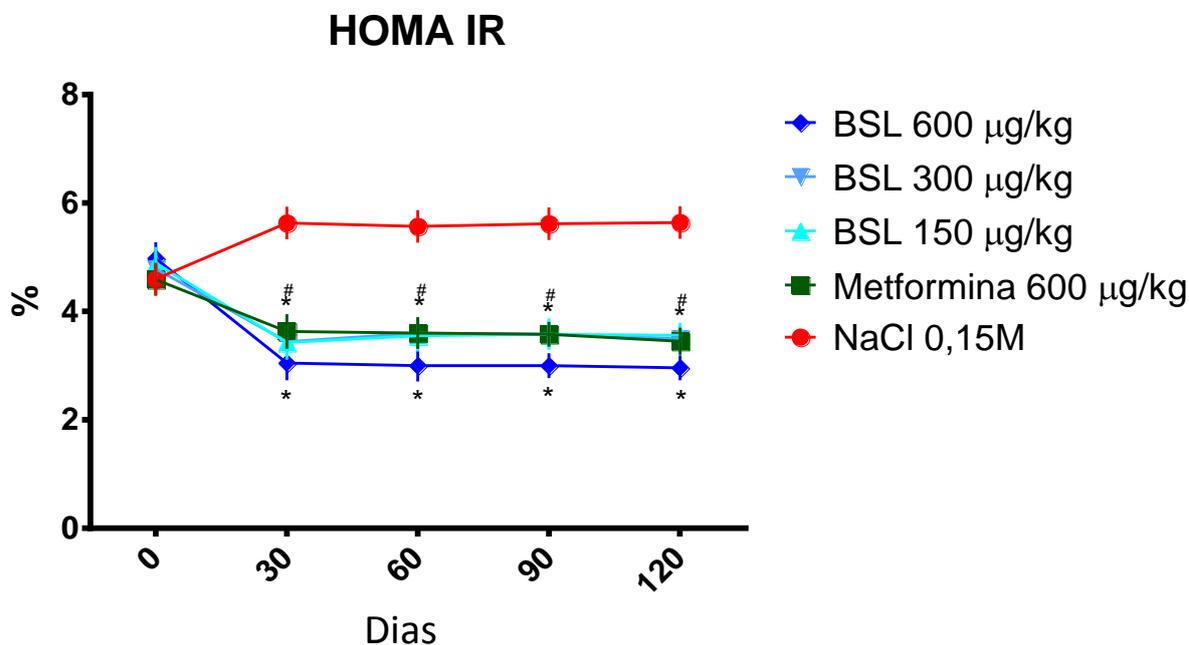
O HOMA consiste num modelo matemático baseado nas concentrações de insulina e glicose em jejum. O HOMA-IR avalia a resistência à insulina e o HOMA- β avalia a capacidade funcional das células β . Como na resistência à insulina, as células não conseguem captar a glicose circulante, há uma hiperglicemia plasmática, e para compensar essa quantidade de glicose, as células β tendem a aumentar a produção de insulina, provocando também uma hiperinsulinemia, na tentativa de se obter uma resposta fisiológica adequada (RADZIUK *et al.*, 2006).

A vantagem de valores HOMA é que os cálculos são relativamente simples e derivam de parâmetros normalmente analisados durante os exames clínicos e laboratoriais de rotina (CERSOSIMO *et al.*, 2014).

A medida de referência para se definir resistência à insulina, de acordo com o fabricante do kit, é de $> 2,7\%$.

A avaliação do método de HOMA-IR (figura 10, p. 54), demonstrou que na primeira coleta (dia 0) todos os grupos do experimento estavam com níveis de resistência à insulina no valor aproximado de 5%. Já nos dias 30, 60, 90 e 120 houve aumento dos níveis de resistência no grupo tratado com NaCl 0,15M e diminuição significativa nos grupos tratados com metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e BSL (600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$), em relação ao controle negativo.

Figura 10. Níveis de HOMA-IR de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborado pelo autor

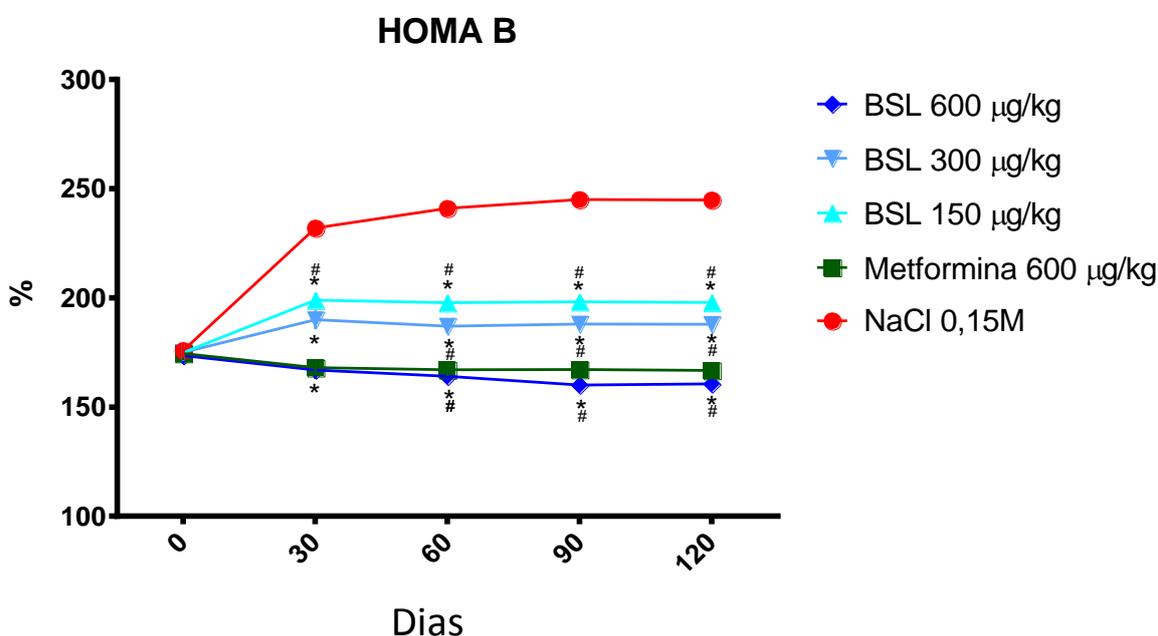
Em estudo realizado por Yang *et al.* (2015), em ratos diabéticos induzidos por nicotinamida-estrepzotocina, observou-se que houve uma maior resistência à insulina em todos os grupos, o que caracteriza o DM2. Ao administrar o extrato da alga vermelha *Gelidium amansii*, observou-se que os níveis de resistência à insulina diminuíram significativamente, corroborando os achados do presente estudo, visto que o grupo tratado com NaCl 0,15M teve aumento dos níveis de resistência, enquanto os demais grupos tratados diminuíram.

Em outro estudo realizado por Kitano *et al.* (2012), utilizando o método de HOMA-IR, percebeu-se que ao utilizar um polissacarídeo derivado da alga vermelha *Porphyra yezoensis*, houve diminuição significativa da resistência à insulina, melhorando o metabolismo da captação de glicose em ratos com diabetes induzido geneticamente.

No que diz respeito à avaliação do HOMA- β (figura 11, p. 55), percebe-se que no dia 0 (primeira coleta), a capacidade funcional das células β se mantém aproximadamente a mesma em todos os grupos tratados. Ao se avaliar o dia 30,

observa-se que houve redução significativa da produção de insulina nos grupos tratados com BSL quando comparados ao controle negativo. Observa-se também, que BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ obteve melhor resultado quando comparadas as duas outras concentrações (300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$). A redução significativa se mantém nos dias 60, 90, 120, ressaltando-se aqui, que nas três coletas subsequentes, BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi estatisticamente igual ao controle positivo, metformina, mostrando diferença significativa nos dias 90 e 120.

Figura 11. Níveis de HOMA- β de ratos diabéticos tratados com BSL nas concentrações de 600, 300 e 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aferidos nos dias 0, 30, 60, 90 e 120. *: $p < 0,05$ comparado ao controle negativo (NaCl 0,15 M #: $p < 0,05$ comparado ao controle positivo (Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$);



Fonte: elaborado pelo autor

É importante ressaltar que no grupo tratado com NaCl 0,15 M a produção de insulina tende a aumentar a cada coleta analisada. E que BSL na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, passados 90 dias do tratamento, a lectina obteve melhor resultado do que o controle positivo.

Os valores de referência para definir hiper-secreção de insulina, devem próximos à 250% e para secreção insuficiente de insulina, próximos a 60%, de acordo com o fabricante do kit. A interpretação dos dados do presente estudo infere que todos os grupos tratados estão com hipersecreção ao início do tratamento, porém, com a administração de BSL, percebe-se uma redução desta secreção.

Sabe-se que o *feedback* entre as fontes endógenas de glicose e as células pancreáticas depende da concentração basal de glicose no plasma que é regulada pela ação da insulina e a concentração de insulina no plasma depende da capacidade de resposta das células β à concentração de glicose. Uma vez que a hipersecreção de insulina não consegue compensar o grau de resistência à insulina, a hiperglicemia se torna clinicamente significativa e a deterioração da residual da célula β é acelerada (CERSOSIMO *et al.*, 2014).

Em relação à análise histopatológica do fígado (figura 12, p. 59), observa-se que em todos os grupos analisados, os hepatócitos estavam bem preservados, apresentando apenas leve congestão e dilatação dos sinusóides, que provavelmente deve-se ao manuseamento do órgão para sua excisão.

A análise do fígado é importante ao se avaliar se a lectina poderia induzir toxicidade celular. Como não foram encontrados sinais de necrose, fibrose ou infiltrado inflamatório, infere-se que a lectina não possui efeitos tóxicos nos hepatócitos. Além desta análise, é importante avaliar os danos hepáticos causados pela hiperglicemia, de acordo com a morfologia das células e ausência de sinais inflamatórios, infere-se que não houve sinais evidentes de presença de danos.

Alves (2015) ao analisar a morfologia das células hepáticas, observou que houve alteração morfológica citoplasmática considerável com presença de granulações inespecíficas e regular congestão de sinusóides hepáticos nos grupos tratados com NaCl 0,15 M e com glibenclamida 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No grupo tratado com BTL 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, houve preservação celular com ausência de granulação citoplasmática e presença de discreta congestão nos sinusóides.

Em estudo realizado por Kang *et al.* (2010), os autores avaliaram as concentrações de alanina aminotransferase (ALT) que se mostraram alteradas quando comparadas ao grupo controle, podendo ser consequência de danos hepáticos. Isto é considerado um resultado da insulino resistência, do aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e do estresse oxidativo. Além disso, a prevalência de elevada ALT é de 3-4 vezes maior em pacientes com diabetes (WEST *et al.*, 2006).

Quando se analisou o corte histológico do pâncreas dos animais de todos os grupos, percebeu-se que houve boa preservação das ilhotas de Langerhans, sem nenhuma presença de necrose ou fibrose. Este efeito pode se dever à administração precoce de nicotinamida, que protege as células β de morte celular (figura 13, p. 60).

Em ilhotas com a presença de DM2 é esperado encontrar redução do seu número e tamanho, infiltração leucocitária e desgranulação das células β pela depleção de insulina armazenada (COTRAN *et al.*, 2000). E em animais que tiveram o diabetes induzido farmacologicamente, as ilhotas podem sofrer alterações funcionais e morfológicas, decorrentes de vários fatores, dentre os quais, a produção de radicais livres (LIMA *et al.*, 2001).

Na análise em relação às ilhotas do pâncreas, foram avaliados: quantidade de ilhotas no pâncreas por corte, de cada lâmina separadamente e depois foi feito a média por grupo, para avaliar se houve disparidades em relação à quantidade por grupo; heterogeneidade entre os tamanhos das ilhotas, para avaliar se o diabetes induzido diminuiu o tamanho das ilhotas ou se a lectina poderia induzir hipertrofia de ilhotas, por isso, analisou-se também a presença de ilhota próximo ao ducto pancreático, que caracteriza probabilidade de hipertrofia de ilhotas (REINECKELUTHGE; KOPPEL, 2000). O resultado encontra-se na tabela 2.

Tabela 2: Média dos grupos com relação à avaliação pancreática:

Grupos	Média quantidade de ilhotas	Média das maiores ilhotas	Heterogeneidade nos tamanhos das ilhotas	Ilhota próximo ao ducto pancreático
NaCl 0,15M	17	333	ELEVADA	LEVE
Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	15,4	294	LEVE	AUSENTE
BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	22,8	358	LEVE	ELEVADA
BSL 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	16,6	466	ELEVADA	LEVE
BSL 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	30	451	ELEVADA	AUSENTE

Fonte: elaborado pelo autor

Observa-se que nos grupos tratados com NaCl 0,15M e metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a quantidade e o tamanho das ilhotas de Langerhans foram menores, quando comparado à todos os grupos tratados com a BSL, podendo indicar que a lectina estimula a produção das células β . Em relação à heterogeneidade dos tamanhos das ilhotas, percebe-se que nos grupos tratados com metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e BSL na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, houve menor divergência entre os tamanhos, podendo indicar que tais tratamentos possuem poder de preservação de ilhota melhor do que os demais. E apenas no grupo tratado com BSL na concentração de 600 e 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foram encontradas ilhotas

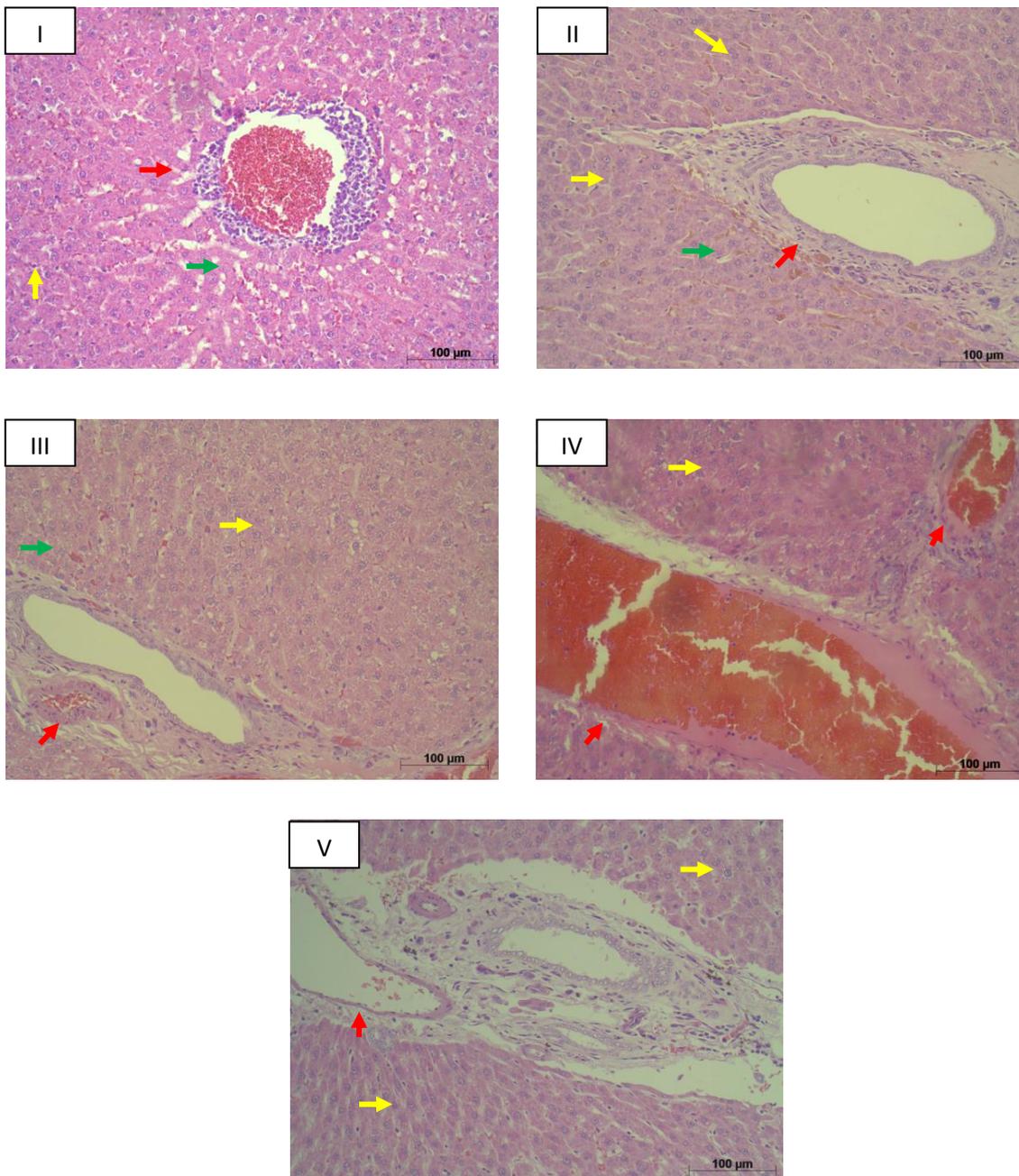
próximas ao ducto pancreático, indicando que a lectina nesta concentração pode estimular a hipertrofia destas células pancreáticas.

Em estudo realizado por Lima *et al.* (2001), em relação à morfologia das ilhotas pancreáticas e levando-se em consideração a área total de células por ilhota, observou-se que as células β dos ratos com Diabetes *mellitus*, induzido por aloxano ou estreptozotocina, estão dispersas e com forma distorcida. Tais dados foram confirmados por Gomes e Dourado (2010) que encontraram alterações no número e tamanho das células β e distorção da citoarquitetura em ratos diabéticos induzidos por aloxano. Já no estudo realizado por Goda *et al.* (2001), não foram encontradas diferenças entre os tamanhos das ilhotas no DM2.

No estudo realizado por Kang *et al.* (2010), a histologia das células das ilhotas pancreáticas mostrou conservação normal das ilhotas no grupo controle (não diabético), no entanto, no grupo diabético tratado com NaCl houve uma clara diminuição na área ocupada pelas células β , com ilhotas de Langerhans encolhidas, exibindo alterações degenerativas, necróticas e vacúolos. Porém, o grupo tratado com o extrato metanólico da alga marinha *Ecklonia cava* obteve recuperação moderada mediante o tratamento, com o aumento do tamanho das ilhotas de Langerhans e exibindo menos mudanças degenerativas em comparação com o grupo tratado com NaCl, o que corrobora com os dados do presente estudo. Tais resultados foram acompanhados por redução significativa da concentração de glicose sanguínea, dos ratos tratados com o extrato. O autor explica a ação do extrato por ativação das vias AMPK-ACC (proteína quinase ativada por AMP) e PI3K, ambas envolvidas na ação da insulina.

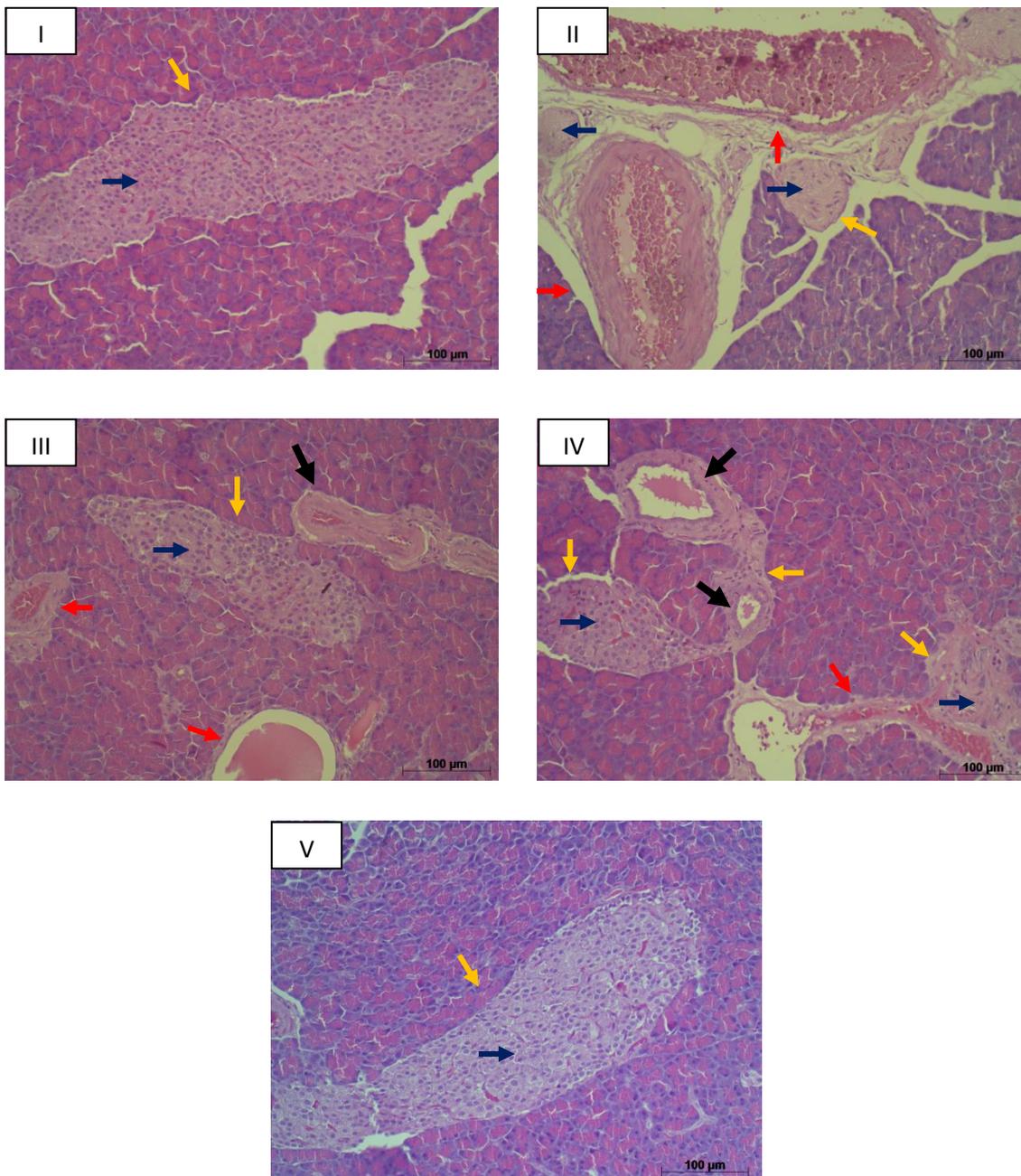
No estudo realizado por Alves (2015), com relação aos achados das células pancreáticas, houve acentuada diminuição do tamanho das ilhotas no grupo controle negativo, com diminuição acentuada da quantidade de células endócrinas. A administração de BTL na concentração de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ apresentou proteção às ilhotas quando comparados aos demais grupos com aumento de celularidade de pâncreas endócrino, também corroborando os achados do presente estudo.

Figura 12. Fotomicrografia de células hepáticas (Aumento 200x) – I. Grupo NaCl; II. Grupo Metformina 600 µg/kg; III. Grupo BSL 600 µg/kg; IV. Grupo BSL 300 µg/kg; V. Grupo BSL 150 µg/kg. Setas vermelhas: vasos; Setas amarelas: hepatócitos com morfologia normal; Setas verdes: congestão dos sinusóides.



Fonte: próprio autor

Figura 13. Fotomicrografia de células pancreáticas (aumento em 200x) – I. Grupo NaCl; II. Grupo Metformina 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$; III. Grupo BSL 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$; IV. Grupo BSL 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$; V. Grupo BSL 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Setas vermelhas: Vasos; Setas laranjas: Ilhotas de Langerhans; Setas azuis: Células β ; Setas pretas: Ductos pancreáticos.



Fonte: próprio autor

6 CONCLUSÕES

- A lectina isolada da alga marinha vermelha *Bryothamnion seaforthii* (BSL) possui efeito na diminuição da hiperglicemia e hiperlipidemia, assim também como no perfil antioxidante em animais diabéticos.
- Os efeitos antihiperglicêmico e antioxidante da BSL assemelharam-se ao tratamento com a droga considerada padrão-ouro, a metformina, muitas vezes obtendo efeito melhor do que à droga. Além disso, mais estudos específicos deverão ser realizados para identificar os prováveis mecanismos de ação da lectina na interação com o receptor de insulina ou outra estrutura.
- Com a avaliação dos testes HOMA, no presente estudo, observou-se que houve diminuição significativa da produção de insulina pelas células β pancreáticas e uma diminuição da resistência à insulina, que, juntamente com a redução da glicemia. Todavia, mais investigações são necessárias para averiguar desta teoria, avaliando a expressão do receptor da insulina e ensaio para aumento de fosforilação, tais como teste de imunohistoquímica e RTq-PCR.
- O resultado do histopatológico deste estudo em conjunto com o perfil bioquímico e enzimático sugere que a BSL induz proteção tecidual, podendo até estimular a proliferação das células β . Contudo, mais estudos, como a imunohistoquímica, precisam ser realizados para avaliação destes dados.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, [S.l.], v. 105, p. 121-126, 1984. Disponível em: <<http://goo.gl/Rj4TBX>>. Acesso em: 22 dez. 2015.
- AINOUZ, I. L. *et al.* Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum*. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, vol. 7, p. 15–19, 1995.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina**, v. 34, n.3, p. 211- 214, 1991.
- ALVES, M. F. A. Atividade antihiperlipidêmica e antioxidante de lectina de *Bryothamnion triquetrum* em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina. 2015. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2009. **Diabetes Care**, v.32, Suppl 1, p. S13-61, Jan 2009.
- ANDRADE, F. K. Caracterização bioquímica e algumas propriedades farmacológicas da alga marinha vermelha *Digenea simplex* (Wulfen) C. Agardh. 2006. Xf. Dissertação (mestrado em bioquímica e biologia molecular) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ARIAS-DÍAZ, J.; BALIBREA, Y. J. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. **Nutr Hosp.** V. 22, n. 2, p. 160-168, 2007.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**; v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BERG, J. M. *et al.* **Biochemistry**. 7ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago 1999.
- BIES, C. *et al.* Lectin-mediated drug targeting: History and applications. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 425-435, 2004.
- BLOCH, K. *et al.* Immobilized Microalgal Cells as an Oxygen Supply System for Encapsulated Pancreatic Islets: A Feasibility Study. **Artif Organs**, v. 30, n. 9, p. 715-718, 2006.
- BOYD, W. C. *et al.* Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. **Transfusion**, v. 6, p. 82-83, 1966.
- BUSE, J. B. *et al.* Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 30, n 1, p. 162-172. Jan 2007.

CAVADA, B. S. *et al.* Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Horm. Metab. Res.**, v. 35, n. 2, p. 125-127, feb. 2003.

CAVAGNOLLI, G. *et al.* hba1c, glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose no diagnóstico de diabetes: que teste usar? **REVHCPA**, v. 30, n. 4 p. 315-320, 2010.

CERSOSIMO, E. *et al.* Assessment of pancreatic β -cell function: review of methods and clinical applications. **Curr Diabetes Rev.**, v.10, n.1, p. 02-42, Jan 2014.

CHERNIKOV, O. V. *et al.* Lectins of Marine Hydrobionts. **Biochemistry** (Moscow), v. 78, n. 7, p. 760-770, 2013.

COTRAN, R. S. *et al.* **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DA DELFINO, V. *et al.* Diabetes *mellitus* induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração **J. Bras. Nefrol.**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DANAEI, G. *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **The Lancet**, v. 378, n. 9785, p. 31 – 40, 2011.

DORNAS, W. C. *et al.* Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 19, n. 2, p. 488-500, Abr./Jun. 2009.

DULIN, W. E. *et al.* Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. **Diabetes**, v. 18, p. 459-466, 1969.

ERION, D. M. *et al.* The role of lipids in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes and associated co-morbidities. **BMB rep.**, v. 49, n. 2, p. 139-148, 2015.

FALLARERO, A. *et al.* Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**, v.10, p. 39–47, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIGUEIREDO, I. S. T. Avaliação do efeito da lectina de *Cratylia floribunda* benth. em feridas cutâneas experimentais. 111 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de pós-graduação em Farmacologia. Fortaleza, Ceará. 2008.

FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of diabetes. **Medicine**. v. 42, n. 12, p. 698–70, Dez 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303914002710>>. Acesso em: 19 Nov. 2015.

FUKUDA, Y. *et al.* The antitumor effect of *Eucheuma serra* agglutinin on cancer cells in vitro and in vivo. **Anticancer drugs**. V.17, p. 943-947, 2006.

GATÉ, L. *et al.* Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherap**, v. 53, n. 4, p. 169-180, 1999.

GODA, K. *et al.* Pancreatic volume in type 1 and type 2 diabetes *mellitus*. **Acta Diabetol.**, v. 38, p.145–149, 2001.

GOMES, A. C. M.; DOURADO, D. T. Efeito do agente indutor de diabetes no pâncreas de ratos wistar tratados com a fração aquosa das partes aéreas da planta *Piper aduncun*. **Anuário da produção de iniciação científica discente**, v. 13, n. 19, p. 9-18, 2010.

GOMES NETO, J. N. F. Avaliação do potencial terapêutico da farinha da casca de *Passiflora edulis* nas dislipidemias e diabetes induzidas. . 113 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de pós-graduação em ciências farmacêuticas. Fortaleza, Ceará. 2009.

HOUSTIS, N. *et al.* Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. **Nature**, v. 440, p. 944-948, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF diabetes atlas**. 6^a ed. 2013.: IDF. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/>. Acesso em: 19 Nov. 2015.

KANG, C. *et al.* Brown alga *Ecklonia cava* attenuates type 1 diabetes by activating Brussels AMPK and Akt signaling pathways. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 509–516, 2010.

KIM, K. *et al.* Potent α -glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2820–2825, 2008.

KITANO, Y. *et al.* Effect of dietary porphyrin from the red alga, *Porphyra yezoensis* on glucose metabolism in diabetic KK-Ay mice. **J. nutri. Sci Vitaminol.**, v. 58, p. 14-19, 2012.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins, Patologia Básica**. 8^a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: Production and practical applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 45-55, 2011.

LE DOUX, S. P. *et al.* Mecanismos de nicotinamide, thymidine protection from alloxan, streptozotocin toxicity. **Diabetes**, v.37, n. 8, p. 1015-1019, aug. 2008.

LEE, S.H.; JEON, Y. J. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. **Fitoterapia**. v. 86, p. 129–136, 2013.

- LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced Diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008. DOI 10.1007/s00125-007.
- LIMA, H. C. *et al.* Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by lectin from red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of applied phycology**, v. 10, p. 153-162, 1998.
- LIMA, M. A. *et al.* Análise quantitativa das células das ilhotas pancreáticas em ratos sob efeito de aloxana. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 34, p. 308-314, jul./dez. 2001.
- LOPES, J. P *et al.* Stress oxidativo e seus efeitos na insulino-resistência e disfunção das células β -pancreáticas: Relação com as complicações do diabetes *Mellitus* tipo 2. **Acta Med Port.**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2008.
- MACEDO, M, L. R. *et al.* Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v. 20, p. 2014-2033, 2015.
- MADEIRA, I. R; *et al.* Ponto de Corte do Índice Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) Avaliado pela Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) na Detecção de Síndrome Metabólica em Crianças Pré-Púberes com Excesso de Peso. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.52, n. 9, p. 1463-1473, 2008.
- MAGDER, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" **Critical Care**, v. 10, n. 1, 208, 2006.
- MASIELLO, P. *et al.* Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, v. 47,p. 224–229, 1998.
- MATTHEWS, D.R. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia.**, v. 28, p.:412-419, 1985.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxido dismutase. An enzymic function for erithrocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.
- MEDINA-RAMIREZ, G. *et al.* Micro-heterogeneity and molecular assembly of the haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthi* and *B. Teiquetrum* from the Caribbean Sea. **Eur. J. Phycol.**, v. 42, n. 1, p. 105-112, 2007.
- MESQUITA, X. A. Caracterização estrutural e atividade hipoglicemiante da lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* C. Lamounox. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado em bioquímica vegetal) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1991. 277 p.
- MORA, A. C. H. *et al.* Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. **Revista de la facultad de química farmacéutica**. v. 16, n. 3, 2009.

MURPHY, P. V. *et al.* The third dimension of reading the sugar code by lectins: design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the aim to define correlations between spatial presentation and activity, **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4026–4053, 2013.

NAGANO, C.S. *et al.* HCA and HML isolated from *hypnea Cervicornis* and *Hypnea Musciformis* define a novel lectin family. **Protein Sci.**, v.14, p. 2167–2176, 2005.

NASCIMENTO, A. S. F. Lectinas recombinantes das algas marinhas vermelhas *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamouroux e *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmelin) M. Howe: produção heteróloga e caracterização bioquímica. 260 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de pós-graduação em bioquímica. Fortaleza, Ceará. 2014.

NASCIMENTO-NETO, L. G. *et al.* Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. **Marine drugs**. Vol. 10, p. 1936-1954, 2012.

NEGRI, G. Diabetes *mellitus*: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, p. 121-142, abr./jun. 2005.

NEVES, S. A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **B.J.M.B.R.** v, 40,n. 1, p. 127-134, 2007.

NOVOA, A. V. *et al.* Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 373-382, set/dez 2001.

NWOSU, F. *et al.* Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine algae. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1.006–1012, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**: report of a WHO consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes *mellitus*. Genebra, c1999. Disponível em: <<http://goo.gl/iZu3mU>>. Acesso em: 09 nov. 2015.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, [S.l.], p. 70, n. 1, p. 158-169, jul. 1967. Disponível em: <<http://goo.gl/ShpiLH>>. Acesso em: 22 dez. 2015.

PEUMANS, W. J; VAN DAMME, J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**; v. 109, p. 347-352, 1995

PEUMANS, W. J., VAN DAMME; E. J. The role of lectins in plant defence. **Histochem J.**, v. 27, n. 4, p. 253-271, Apr- 1995.

PINTO, V.P.T. *et al.* Lectins from the red marine algal species *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum* as tools to differentiate human colon carcinoma cells. **Adv. Pharmacol. Sci.** 2009, doi:10.1155/2009/862162.

RADZIUK, J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. **JCEM**, v. 86, p. 4615-4617, 2006.

REINECKELUTHGE, A. K.F.; KOPPEL, G. The molecular basis of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and its pathologic substrates. **Virchows Arch**, v. 436, p. 1-5, 2000.

REIS, J. S. *et al.* Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no DM1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 52, n. 7, p. 1096-1105, 2008.

ROCHA, F. D. *et al.* Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev. Bras. Farmacogn.** v.7, n. 4, p. 631-639, Out./Dez. 2007.

SAMPAIO, A. H. *et al.* Hemaglutininas de Algas Marinhas. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 5, n. 2, p.171-177, 1993.

SATO, K. L. *et al.* Neuropatia autonômica diabética. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 39, n, 1, p. 28-38, jan./mar de 2006.

SEO, M. J. *et al.* Extract from Edible Red Seaweed (*Gelidium amansii*) Inhibits Lipid Accumulation and ROS Production during Differentiation in 3T3-L1 Cells. **Prev Nutr Food Sci**, v. 17, p. 129-135, 2012.

SGARBI, J. A.; VILLAR, H.C.C. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira (AMB), Conselho Federal de Medicina (CFM). **Diabetes Mellitus: Tratamento Medicamentoso**. São Paulo: AMB/CFM; Nov de 2004.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins cell agglutinating and sugar – specific proteins. **Science**, v. 177, p.: 949-958, 1972.

SHI, D. *et al.* HPN, a Synthetic Analogue of Bromophenol from Red Alga *Rhodomela confervoides*: Synthesis and Anti-Diabetic Effects in C57BL/KsJ-*db/db* Mice. **Mar. Drugs**, v. 11, p.:350-362, 2013.

SILVA, M. *et al.* Efeito da estreptozotocina sobre os perfis glicêmico e lipídico e o estresse oxidativo em hamsters. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.55, n.1, p. 46-53, 2011

SMUSHKIN, G.; VELLA, A. What is type 2 diabetes? **Medicine**. v. 38, n. 11, p. 597-601, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2014-2015**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2015. Disponível em: < <http://www.diabetes.org.br/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf> >. Acesso em: 15 nov. 2015.

SUMNER, J.B. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*. **J. Biol. Chem.**, v.37, p.137–142, 1919.

TEIXEIRA, C. S. Determinação da estrutura tridimensional de uma lectina da semente de *Camptosema pedicellatum* Benth por cristalografia de raios X. 98 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Curso de pós-graduação em bioquímica. Fortaleza, Ceará. 2012.

TEIXEIRA, E. H. *et al.* In vitro inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001–1006, 2007.

UCHIGATA, Y. *et al.* 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(4), p. 316-3188, apr -1983.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidant in oxidative stress – induced cancer. **Chemical-biologicalinteractions**. v. 60, p. 1-40, 2006.

VAN DAMME, E. J. *et al.* A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.** v.17, p. 575–692, 1998.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**, v. 183, n. 2, p. 258-264, jan-1991.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/365272>.

VIDAL, A. *et al.* Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelin) Howe. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, p. 509–600, 2006.

VIEIRA, L.A.P.; *et al.* The alga *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive activity. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 7, p.1071-1079, jul. 2004.

WEINERT, L. S. *et al.* Tratamento medicamentoso da hiperglicemia no diabetes *mellitus* tipo 2. **Rev HCPA**, v. 30, n.4, p. 372-381, 2010.

WEST, J. *et al.* Elevated serum alanine transaminase in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. **QJM**, v. 99, p. 871–876, 2006.

WU, J.; YAN, L. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.8, p. 181–188, 2015.

YANG, T. *et al.* Red algae (*Gelidium amansii*) reduces adiposity via activation of lipolysis in rats with diabetes induced by streptozotocin-nicotinamide. **JFDA**. v. 30, p. 1-8, 2015.

YAU, T. *et al.* Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v.20, p. 3791-3810, 2015.

YOSHIKAWA, T; NAITO, Y. What is oxidative stress? **JMAJ.**, v. 45, n. 7, p. 271-276, 2002.