

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA ULTRASSENSÍVEL EM RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM RUTINA

Lediane Tomazi*
Filomena Marafon**
Eduardo Ottobelli Chielle***

Resumo

O Diabetes *mellitus* compreende um grupo de desordens metabólicas que envolvem mecanismos patogênicos distintos, caracterizado por anormalidades no metabolismo da glicose e outras substâncias produtoras de energia, que desenvolvem complicações vasculares e neuropáticas. Com as complicações crônicas associadas, particularmente ao diabetes malcontrolado, a aterosclerose constitui um grave problema à cardiopatia isquêmica e ao infarto. Nesse caso, a proteína C reativa ultrasensível (PCR-us) é uma das proteínas de fase aguda do processo inflamatório, cujas concentrações se elevam significativamente durante a resposta inflamatória. Estudos têm demonstrado que a ingestão de compostos como a rutina tem diminuído as concentrações de glicose, funcionando também como antioxidante, contribuindo para a redução do processo inflamatório. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da rutina sobre a atividade da proteína C reativa ultrasensível, em modelo animal de diabetes induzido por estreptozotocina (STZ). Este estudo se caracteriza como experimental, em que foram utilizados ratos machos Wistar. O diabetes foi induzido nos animais por meio de injeção única intraperitoneal de STZ, 55 mg/Kg. A rutina foi administrada em uma concentração de 100 mg/Kg/dia, e a concentração de glibenclamida foi de 10 mg/Kg/dia, durante 30 dias. Considerando os resultados, o flavonóide rutina atingiu resultados significativos na diminuição de níveis glicêmicos, apresentou controle sob os níveis de PCR-us e na diminuição da fração LDL-C, contribuindo para amenizar o processo inflamatório gerado pelo DM1 e favorecendo uma diminuição de complicações do risco aterogênico em indivíduos com DM1.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*. Rutina. Proteína C reativa ultrasensível.

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é considerado um distúrbio crônico, caracterizado por anormalidades no metabolismo da glicose e outras substâncias produtoras de energia, que desenvolvem complicações vasculares e neuropáticas. Independentemente de sua etiologia, a doença está relacionada a um defeito hormonal, ou seja, à deficiência da ação e/ou secreção de insulina, que pode ser total, parcial ou relativa (CUMAOĞLU et al., 2011; GOLDMAN; AUSIELLO, 2005).

* Graduada em Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina; ledianetomazi@gmail.com

** Graduada em Biomedicina pela Universidade do Oeste de Santa Catarina; marafon_filo@hotmail.com

*** Professor da Universidade do Oeste de Santa Catarina no Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde; eduardochielli@bol.com.br

Segundo Kumar, Abbas e Fausto (2005), a maioria dos casos de diabetes se enquadra em duas grandes categorias:

- a) Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1): caracterizado pela destruição das células betapancreáticas, acarretando na deficiência absoluta de insulina e representando cerca de 10% dos casos de diabetes;
- b) Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2): causado por uma combinação de resistência periférica à insulina e uma resposta secretora inadequada das células beta; corresponde a aproximadamente 90% dos casos.

O DM compreende um grupo de desordens metabólicas que envolvem mecanismos patogênicos distintos. Ele se manifesta por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar ao risco de vida (GROSS, et al., 2002). Com as complicações crônicas associadas, particularmente ao diabetes malcontrolado, a aterosclerose constitui um grande problema para a cardiopatia isquêmica e o infarto. Nesse caso, a PCR-us é uma das proteínas de fase aguda do processo inflamatório, cujas concentrações se elevam significativamente durante a resposta inflamatória (LIMA et al., 2007).

A rutina é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonóis que tem sido intensamente pesquisada e seus resultados estão interessando, constantemente, às indústrias farmacêuticas (NEGRI, 2005). A rutina foi o primeiro flavonoide descoberto, tendo uma ampla distribuição no reino vegetal (MIYASHIRO, 2010). Apresenta várias atividades biológicas benéficas ao ser humano, que têm sido objeto de estudo em diversas áreas, contribuindo para o futuro tratamento de várias enfermidades (BECHO; MACHADO; GUERRA, 2009).

Dessa forma, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da rutina sobre a PCR-us, um marcador importante de processo inflamatório, especialmente da placa aterosclerótica, um fator contribuinte à morbidade e à mortalidade de pacientes diabéticos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No estudo experimental, foram utilizados ratos machos Wistar, provenientes do biotério da Universidade do Oeste de Santa Catarina de São Miguel do Oeste.

Os animais foram agrupados em caixas plásticas, com assoalho contendo maravalha e mantidos em ambiente com temperatura controlada (22 ° – 24 °C). A luminosidade foi controlada em ciclo de 12 horas com luz e 12 horas de escuro. Receberam água e ração, sendo uma dieta normoproteica (12% de proteínas).

Foram utilizados seis grupos de animais, cada grupo contendo cinco ratos:

- a) Grupo 1: Controle – Saudável: Citrato de sódio (0.02M pH 4,5) intraperitoneal;
- b) Grupo 2: Controle – Saudável: Tratados com hipoglicemiante (glibenclamida);
- c) Grupo 3: Controle – Saudável: Tratados com rutina;
- d) Grupo 4: Teste – Diabético não tratado: STZ intraperitoneal;

- e) Grupo 5: Teste – Diabético: Tratados com rotina;
- f) Grupo 6: Teste – Diabético: Tratados com hipoglicemiante (glibenclamida).

O diabetes foi induzido nos animais após um período de jejum de 12 horas, por meio de injeção única intraperitoneal de STZ, 55 mg/Kg diluída em tampão de citrato de sódio (0.01 M pH 4,5), injetada 10 minutos após a diluição (DIAS, 2001).

Decorrida 24 horas após a administração da STZ foi avaliado se houve a indução do diabetes, por intermédio da medida da glicemia em amostra de sangue colhida da veia caudal ao glicosímetro. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicose sanguínea igual ou superior a 250 mg/dL. Os níveis de glicose foram avaliados 48 horas após a indução e, posteriormente, a cada sete dias, até o final do experimento (DIAS, 2001).

A rotina e a glibenclamida foram administradas com o auxílio de uma cânula orogástrica (gavage); a rotina foi administrada em uma concentração de 100 mg/Kg/dia, enquanto a concentração de glibenclamida foi de 10 mg/Kg/dia.

A glibenclamida foi escolhida, pois está no mercado há muito tempo, tendo seu uso difuso e suas propriedades hipoglicemiantes conhecidas.

Ao final do experimento, no 31º dia, os animais foram transportados do biotério ao laboratório de bioquímica da Unoesc para serem anestesiados e, posteriormente, coletadas as amostras, que foram sangue total com EDTA e sangue sem anticoagulante para a obtenção de soro.

As amostras sanguíneas foram obtidas dos animais anestesiados por meio da coleta de sangue da veia cava inferior. Após, foram colocadas em tubos de ensaio; o tubo sem anticoagulante foi submetido à centrifugação de 3500 rpm para a obtenção do soro.

Foram realizadas as seguintes análises: glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos e dosagem de PCR-us.

A análise de todas as informações coletadas nesta pesquisa foi inicialmente feita de forma descritiva. Para as variáveis quantitativas foram calculadas algumas medidas-resumos, como média e porcentagem, e confeccionados os gráficos e tabelas. Os dados foram digitados em planilhas no Microsoft Office Excel 2007 para um adequado armazenamento das informações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo experimental com ratos machos Wistar, para testar o efeito da rotina sobre o diabetes, quanto à avaliação da PCR-us, foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa e se procedeu o estudo com os animais.

A utilização da STZ pela via intraperitoneal, na dose de 55 mg/kg, foi efetiva na indução do diabetes, pois a verificação da glicemia após decorridas 48 horas, por meio do uso do glicosímetro, demonstrou níveis glicêmicos elevados (>250 mg/dL), enquanto que os ratos não diabéticos (os que não foram induzidos), apresentaram níveis glicêmicos normais, conforme média apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Média da glicemia inicial dos grupos estudados

GRUPOS	GLICEMIA (mg/dL)
Grupo 1	108,4 mg/dL
Grupo 2	108,8 mg/dL
Grupo 3	104,4 mg/dL
Grupo 4	422,4 mg/dL
Grupo 5	514,6 mg/dL
Grupo 6	528,8 mg/dL

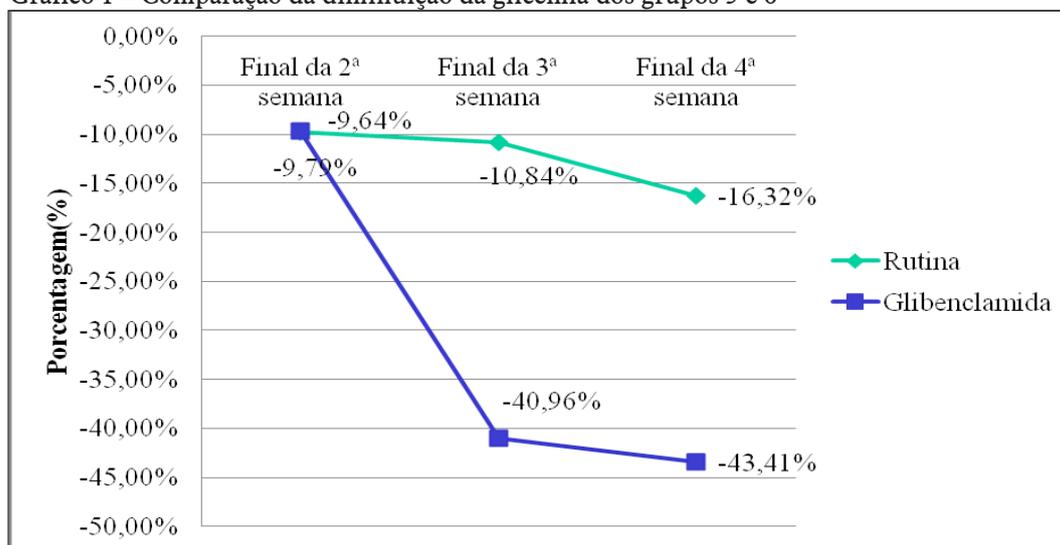
Fonte: os autores.

Segundo estudos, a administração de STZ em animais demonstrou-se eficaz no que diz respeito à hiperglicemia e também a parâmetros como níveis normais de corpos cetônicos, ácidos graxos livres plasmáticos e níveis normais glicolíticos, glicogênio e citrato. Conclui-se assim, que a substância dificilmente ocasionará outros problemas agravantes, ao contrário de outras substâncias que já foram estudadas para induzir o diabetes, em que, além de provocarem uma hiperglicemia, ocasionaram um certo grau de toxicidade (SATO et al., 2006).

A STZ é uma droga que atua diretamente na indução da morte das células betapancreáticas que, quando administrada em animais saudáveis, causa uma grave deficiência de liberação da insulina e o DM se desenvolve em um ou dois dias (DIAS, 2005).

Os níveis de glicose obtidos neste estudo, em relação ao efeito da rotina, foram positivos. Embora os níveis glicêmicos dos animais tratados com rotina não tenham diminuído na mesma proporção que o grupo tratado com glibenclamida, representou, ao final do experimento, uma diminuição positiva. O Gráfico 1 mostra esta relação:

Gráfico 1 – Comparação da diminuição da glicemia dos grupos 5 e 6



Legenda: O grupo 5 corresponde aos ratos diabéticos tratados com rotina, sendo o grupo 6 os ratos diabéticos tratados com glibenclamida

Fonte: os autores.

Como se percebe, o tratamento com o flavonoide de estudo rotina diminuiu os níveis de glicose em 16,32%, em 30 dias de estudo. Observou-se que, ao final da segunda semana de tratamento, o efeito da rotina se igualou ao da glibenclamida, diminuindo mais de 9%. No final da terceira semana, a glibenclamida agiu em uma diminuição somando 40,96%, enquanto a rotina

somou uma diminuição de 10,84%. Houve uma grande diminuição da glibenclamida no final da terceira semana, porém, a rutina diminuiu mais que a glibenclamida no final da quarta semana.

Embora a glibenclamida, em um período de 30 dias, tenha uma percentual maior na diminuição da glicose, a rutina, em todas as dosagens, também teve uma diminuição expressiva, demonstrando que o uso do componente flavonoide rutina desempenha condições de agir no controle da hiperglicemia.

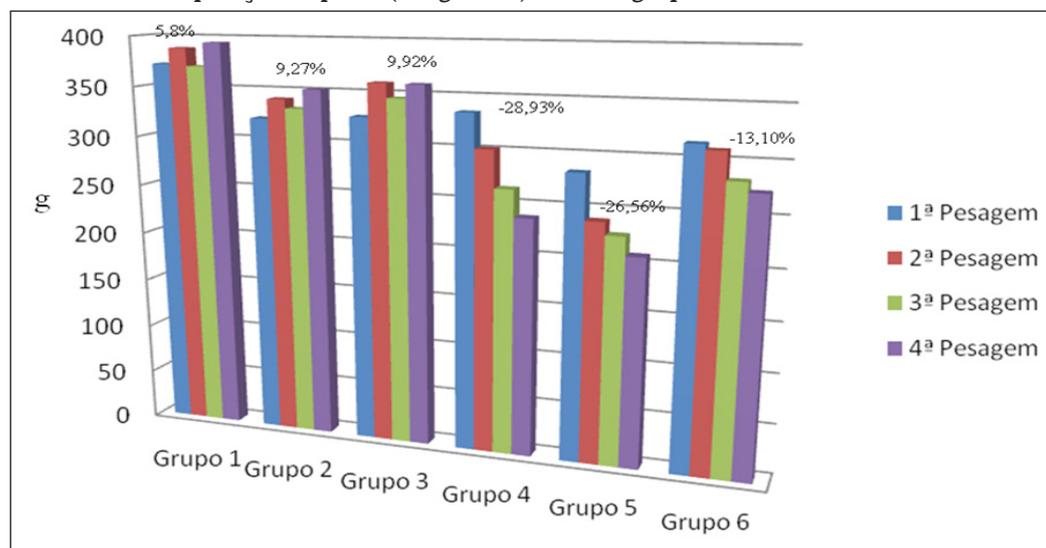
Em seus estudos, Kamalakkanan e Prince (2006), investigando o efeito antidiabético e antioxidante da rutina, constataram um efeito redutor da glicemia de 62,73%, em um período de 45 dias. Com esses resultados, os autores concluíram que a rutina apresenta efeito antidiabético e atividade antioxidante em ratos diabéticos, induzido por STZ, pois o composto tem capacidade de varrer os radicais livres e inibir a peroxidação lipídica, prevenindo o estresse oxidativo e protegendo as células beta pela diminuição dos níveis de glicose no sangue.

Em relação ao peso, os grupos foram acompanhados por várias pesagens individuais. Observou-se que os grupos não diabéticos (grupos 1, 2 e 3) tiveram um pequeno ganho de peso quando comparados aos grupos diabéticos (grupos 4, 5 e 6), demonstrando em alguns casos uma expressiva redução de peso. Esta relação de pesos permite comparar com os sinais e sintomas dos pacientes diabéticos, por haver uma redução de peso depois da manifestação do diabetes. Esses resultados foram vistos com uma expressividade maior no grupo 4, ratos diabéticos que não recebiam tratamento, tendo uma diminuição do seu peso em 30 dias, de 28,93%.

Em estudo realizado por Dias (2005), em ratos, com o uso de um composto da classe dos flavonoides, após oito semanas de experimentos, também observou que o peso corporal dos animais diabéticos reduziu significativamente em relação ao grupo-controle, em torno de 28,1%, com nível de significância de $p < 0,05$, dado bem próximo ao encontrado neste estudo, em que ratos diabéticos tratados com rutina diminuíram 26,53%, em 30 dias.

Conforme se observa no Gráfico 2, os grupos não diabéticos 1, 2 e 3 aumentaram seu peso em 5,8%, 9,27% e 9,92%, respectivamente; enquanto os grupos 5 e 6 diminuíram 26,53% e 13,10%, respectivamente.

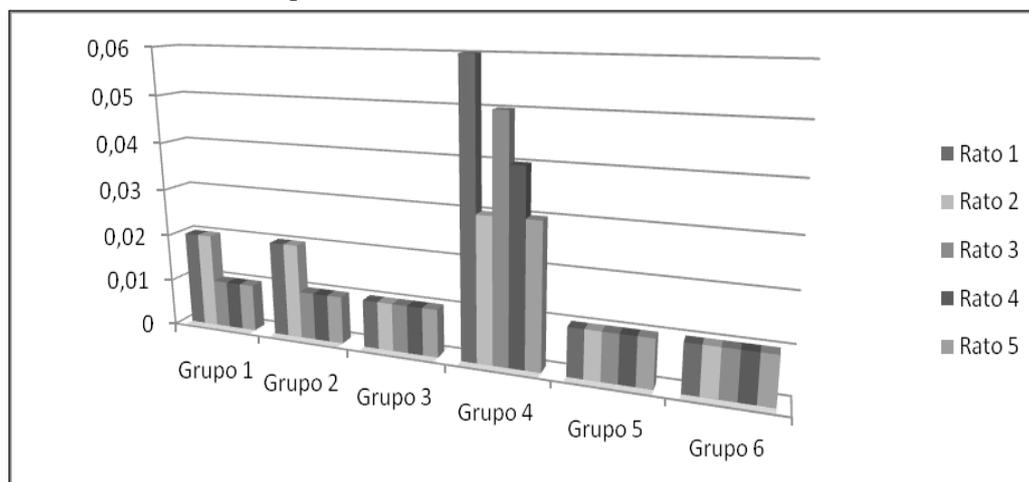
Gráfico 2 – Comparação de pesos (em gramas) entre os grupos



Fonte: os autores.

No presente estudo, verificou-se que os níveis de PCR-us foram elevados no grupo 4 (ratos diabéticos não tratados), apresentaram níveis da proteína mais aumentados, quando relacionados aos outros grupos. A média dos grupos um e dois ficou em 0,014mg/dL, os grupos 3, 5 e 6 com 0,01mg/dL e o grupo 4 com 0,042mg/dL. O Gráfico 3 mostra as dosagens obtidas em cada rato, conforme o grupo de estudo.

Gráfico 3 – Níveis de PCR-us (mg/dL) obtidos por rato, conforme o grupo de estudo, no final do experimento



Fonte: os autores.

Com esses valores, percebeu-se que o grupo 4 teve níveis aumentados. Esses resultados sugerem um início do processo inflamatório, pois os grupos 5 e 6, que também eram diabéticos, porém tratados, apresentaram valores de 23,81% mais baixos, quando comparados aos ratos apenas diabéticos.

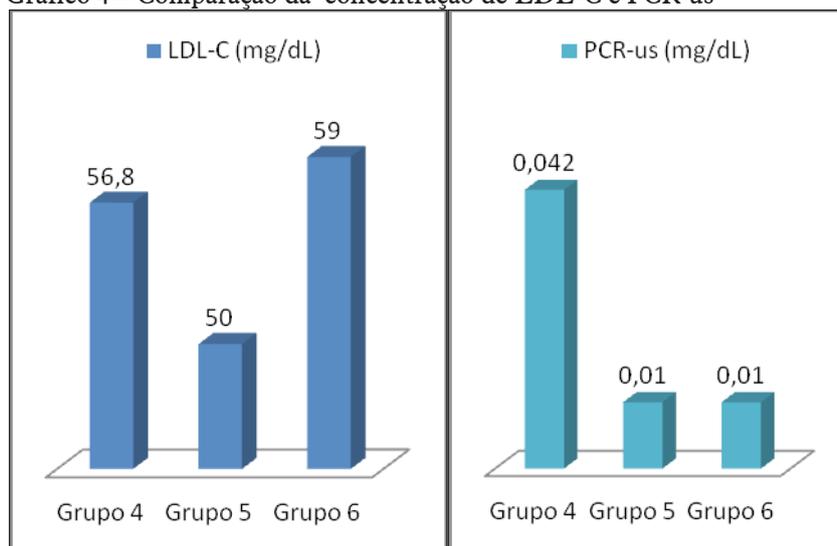
Outro achado interessante é a média da PCR-us no grupo 3, pois quando comparada aos grupos 1 e 2, que também eram ratos saudáveis, apresentou níveis mais diminuídos. Dessa forma, subentende-se que o uso da rotina em animais saudáveis proporcionou uma diminuição dos níveis de PCR-us, bem como no grupo diabético.

Ao comparar o perfil lipídico do grupo diabético tratado com rotina (G5), com o grupo tratado com glibenclamida (G6), avaliando a fração do colesterol lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), verificou-se que o grupo 5 (rotina) apresentou uma média reduzida da fração LDL-C (50 mg/dL), quando comparada ao grupo 6 (59 mg/dL). Esses resultados permitem destacar que a rotina proporcionou à diminuição dessa lipoproteína, diminuindo assim o risco aterogênico presente no DM.

Os gráficos a seguir mostram a relação entre os valores obtidos de PCR-us e LDL-C. O grupo 4 (diabéticos não tratados) apresentou níveis elevados de PCR-us (0,042mg/dL), bem como de LDL-C (56,8 mg/dL), o grupo 5 (tratados com rotina) apresentou níveis normais de PCR-us (0,01 mg/dL) e da fração LDL-C (50 mg/dL), o grupo 6 (tratados com glibenclamida) apresentou níveis de PCR-us normais (0,01 mg/dL) e LDL-C (59 mg/dL).

Analisando os resultados do grupo 4, é possível observar que, mesmo não sendo o valor mais elevado de LDL-C, com as concentrações de PCR-us, é considerável indicador de risco aterogênico.

Gráfico 4 – Comparação da concentração de LDL-C e PCR-us



Fonte: os autores.

Percebeu-se que o composto estudado rutina desencadeou um melhor controle nesses parâmetros quando comparado ao grupo tratado com glibenclamida.

Para essa relação de dados, sugere-se que a diminuição do LDL-C e o controle da PCR-us, obtidos no grupo de estudo (grupo 5), contribui como fatores importantes para a diminuição do risco aterogênico, provocado em pacientes com DM. Considerando esses resultados, acredita-se que o flavonoide rutina desencadeou um papel fundamental para o controle e a propagação de doenças ateroscleróticas, por demonstrar resultados positivos nos parâmetros clínicos que indicam essa patologia.

4 CONCLUSÃO

A utilização de STZ na dose de 55 mg/Kg foi eficaz na indução do DM1, pois teve-se, neste estudo, 100% dos animais induzidos, diabéticos, apresentando níveis glicêmicos maiores que 250 mg/dL.

O uso do componente da classe dos flavonoides rutina, substância pesquisada no trabalho, atingiu resultados positivos no que diz respeito à diminuição de níveis glicêmicos, pois o grupo testado diminuiu em 16,32% seus níveis em 30 dias de estudo.

Neste estudo, o flavonoide rutina também proporcionou uma diminuição da concentração de PCR-us, pois somente o grupo diabético não tratado (grupo 4) apresentou níveis aumentados, enquanto que o grupo diabético tratado com rutina apresentou valores semelhantes aos grupos saudáveis, sugerindo que este flavonoide proporciona uma proteção contra aterogênese em organismos diabéticos.

Outro achado de interesse para este estudo foi a diminuição da fração LDL-C, que quando associada à PCR-us pode ser um forte aliado para a indicação de risco aterogênico. No caso desses resultados, os animais tratados com rutina tiveram uma diminuição de PCR-us e LDL-C, que, quando analisados, sugeriu-se que o componente estudado favorece uma diminuição do risco aterogênico em indivíduos com DM.

Considerando os resultados deste estudo experimental, concluiu-se que a utilização do flavonoide rutina desempenha ações de interesse no controle e na propagação de complicações provocadas pelo DM, como a diminuição da glicose e do risco aterogênico. Dessa forma, é importante um aprofundamento sobre tais constatações por meio de novos estudos que colaborem com as evidências, que neste foram encontradas, uma vez que estudos como este se encontram escassos na literatura atual, podendo contribuir com novas perspectivas de saúde pública.

Abstract

Diabetes mellitus comprises a group of metabolic disorders that involve distinct pathogenic mechanisms, characterized by abnormalities in the metabolism of glucose and other substances energy-producing, which lead to the development of vascular and neuropathic complications. Along the complications chronic associated, particularly in poorly controlled diabetes, atherosclerosis is a major problem for ischemic heart disease and myocardial infarction. In this case, the ultra-sensitive C-reactive protein (hs-CRP) is an acute-phase proteins in the inflammatory process, with concentrations significantly increase during the inflammatory response. Studies have shown that intake of compounds such as rutin, have decreased concentrations of glucose, while also acting as an antioxidant, helping to reduce inflammation process. The present study aimed to evaluate the effect of rutin on the activity of ultrasensitive C-reactive protein in an animal model of diabetes induced by streptozotocin (STZ). This study is characterized as experimental, which were used male rats, Wistar. Diabetes was induced in animals by single injection intraperitoneal of STZ, 55 mg/kg. Rutin was administered at a concentration of 100 mg/kg/day, and the concentration of glibenclamide was 10 mg/kg / day for 30 days. Given the results, the flavonoid rutin, achieved significant results in lowering blood glucose levels, had control over the levels of hs-CRP and the reduction of LDL-C, helping to alleviate the inflammatory process generated by DM1 and favoring a decrease the atherogenic risk of complications in individuals with DM1.

Keywords: Diabetes mellitus. Rutin. Ultrasensitive C-reactive protein.

REFERÊNCIAS

BECHO, Juliana Raso Marques; MACHADO, Hussen; GUERRA, Martha de Oliveira. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista interdisciplinar de estudos experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

CUMAOĞLU, et al. Effects of olive leaf polyphenols against H₂O₂ toxicity in insulin secreting β -cells. **Revista Acta biochimica polonica**, v. 58, p. 1-7, 2011.

DIAS, Alexandre Simões. **Avaliação do estresse oxidativo e do fluxo sanguíneo na artéria mesentérica de ratos diabéticos por indução de estreptozotocina**. 2001. 90 p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas: Concentração em Fisiologia)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

_____. **O antioxidante quercertina diminui o estresse oxidativo hepático em ratos diabéticos.** 2005.111 p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GOLDMAN, Lee; AUSIELLO, Dennis: **Cecil: tratado de medicina interna.** 22. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 2927 p.

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

KAMALAKKANNAN, Narasimhanaidu; PRINCE, Ponnaian Stanely Mainzen. Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin, a Polyphenolic Flavonoid, in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, n. 98, p. 97-103, 2006.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abel; FAUSTO, Nelson. **Patologia: Bases patológicas das doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

LIMA, Luciana M. et al. High-sensitivity C-reactive protein in subjects with type 2 diabetes mellitus and/or high blood pressure. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 6, p. 956-960, 2007.

MIYASHIRO, Carla Adriana Hartmann Vieira. **Avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do flavonoide rutina e derivados contendo metal de transição.** 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)–Universidade Bandeirante de São Paulo, São Paulo, 2010.

NEGRI, Giuseppina. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

SATO, Vanessa Migliaccio et al. Diabete como modelo de neuropatia autonômica. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR, 10., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto, v. 1, n. 39, p. 28-38, 2006.

