

AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DOS HEPATÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM NEEM (*Azadirachta indica*, A. Juss) E ESTREPTOZOOTOCINA 6 CH

Matheus Henrique Magalhães Silva¹
Maria Rita Pacheco²
Annita Morais Girardi³
Silvana Martinez Baraldi-Artoni⁴
Fabiana Ribeiro Barreiro⁵

SILVA, M. H. M.; PACHECO, M. R.; GIRARDI, A. M.; BARALDI-ARTONI, S. M.; BARREIRO, F. R. Avaliação morfológica dos hepatócitos de ratos diabéticos tratados com neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) e estrepto-zootocina 6 ch. *Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR*, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 111-119, maio/ago. 2011.

RESUMO: Foram avaliados os efeitos de extratos de *Azadirachta indica*, A. Juss e da estrepto-zootocina em ultra-alta diluições em sistemas dinamizados, sobre a morfologia dos hepatócitos de ratos com diabetes mellitus induzida por estrepto-zootocina. A análise histológica dos hepatócitos, mediante a coloração por hematoxilina e eosina, revelou que o diabetes *mellitus* não alterou a estrutura destas células durante os 30 dias de período experimental, assim como, não afetou a síntese e o armazenamento de glicogênio hepático, fato este evidenciado pela coloração por PAS/Hematoxilina. Não foram detectadas diferenças morfológicas entre os grupos experimentais analisados, indicando que as substâncias hipoglicemiantes administradas, também não exerceram nenhum efeito sobre o fígado dos animais.

PALAVRAS-CHAVE: *Azadirachta indica*. Diabetes *mellitus*. Estrepto-zootocina. Fígado. Morfologia.

MORPHOLOGICAL EVALUATION OF HEPATOCYTES FROM DIABETIC RATS TREATED WITH NEEM (*Azadirachta indica*, A. Juss) AND STREPTOZOTOCIN 6 CH

ABSTRACT: The effects of extracts from *Azadirachta indica*, A. Juss, and streptozotocin in extreme high dilutions in dinamized systems on hepatocyte morphology of rats with *diabetes mellitus* induced by streptozotocin were evaluated. The histological analysis of hepatocytes after Hematoxylin and Eosin staining evidenced that the *diabetes mellitus* did not alter the structure of these cells during the experimental period (30 days), as well as did not affect the synthesis and storage of hepatic glycogen when PAS/Hematoxylin staining was used. Morphological differences were not detected among the experimental groups, indicating that the hypoglycemic substances tested in this present experiment did not cause any effect on animal liver.

KEYWORDS: *Azadirachta indica*. Diabetes *mellitus*. Liver. Morphology. Streptozotocin.

Introdução

Várias espécies vegetais foram incorporadas à medicina tradicional devido ao seu uso experimental, compilando resultados positivos ou negativos quanto à sua ação farmacológica (Di STASI, 1996). Assim, julga-se importante o estudo de plantas medicinais, incentivado pela própria Organização Mundial da Saúde (OMS), principalmente por razões econômicas e sociais (MARTINS et al., 1998).

Azadirachta indica, A. Juss, planta da família *Meliaceae* também conhecida como Nim (Neem), é originária das regiões áridas da Índia (CHOPRA, 1958; SAXENA, 1993), muito resistente, não exi-

gente em solo, de crescimento rápido, alcança de 10 a 15 metros de altura (SCHMUTTERER, 1990) e prefere climas tropicais (KOCH, 1990). O Neem foi introduzido no Brasil em 1993, na EMBRAPA-CNPAF (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão) em Goiânia - GO, com o intuito de preparação de carrapaticida para bovinos. Sabe-se que possui uma grande concentração de terpenóides (RAGASA et al., 1997) e estes compostos são, em sua maioria, os responsáveis pelas suas ações terapêuticas. O extrato de suas folhas teve a ação hipoglicemiante mais potente, quando comparada a outras plantas medicinais em ratos normais e diabéticos induzidos por estrepto-zootocina (CHATTOPAHYAY, 1999; ALAM;

¹Mestrando na área de Clínica Médica Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal. Endereço: Travessa Fortunato Fávero, 70, Vila Maria Luiza, CEP 14055-349, Ribeirão Preto - SP. Email: matheushms@hotmail.com.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP. Email: rpacheco@fcav.unesp.br.

³Mestranda na área de Clínica Médica Animal, Departamento de Clínica e Cirurgia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal. Endereço: Rua Abrahão Diniz, 214, Jardim Marajoara, CEP 14500-000, Ituverava - SP. Email: annitamgirardi@gmail.com.

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal. Endereço: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP. Email: smbart@fcav.unesp.br.

⁵Mestranda na área de Medicina Veterinária Preventiva, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Jaboticabal. Endereço: Avenida Ayrton Senna, 333, apartamento 403B, Santa Luzia, CEP 14883-108, Jaboticabal - SP.

SIDDIQUI; HUSSAIN, 1990). Khosla et al. (2000) confirmaram seu efeito hipoglicemiante em coelhos diabéticos aloxânicos tratados com extratos de folhas e óleo das sementes da *Azadirachta indica* e, comparando-a à glibenclâmida, sugeriram que esta planta seria benéfica no controle dos níveis glicêmicos do *diabetes mellitus*. Porém, Rosa et al. (2010), consideraram duvidoso seu uso no controle da glicemia de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina pois, ao final do estudo, os níveis glicêmicos dos animais tratados com extratos aquoso e hidroalcoólico de suas folhas foram maiores que os do grupo controle branco diabético. Parshad; West; Gardner (1999) encontraram melhora significativa nos pesos e diminuição da mortalidade de ratos com diabetes induzida por estreptozotocina tratados com extrato aquoso do Neem, porém, não ocorreu normalização dos níveis glicêmicos. Khosla et al. (2000) observaram efeito hipoglicemiante do extrato das folhas e do óleo das sementes de *Azadirachta indica* em coelhos diabéticos induzidos pela aloxana, tanto no grupo tratado preventivamente 2 semanas antes da indução quanto no tratado por 4 semanas após a indução, podendo ser benéfica no controle e na prevenção do aparecimento da doença.

Biswas et al. (2002) descreveram que o extrato aquoso das folhas do Neem, quando fornecido oralmente, reduz a glicemia em ratos normais e diabéticos induzidos experimentalmente, possivelmente devido à presença de um flavonóide, a quercetina. Um efeito hipoglicêmico significativo também foi observado pela alimentação de coelhos em jejum com óleo de Neem, assim como, pelo extrato de folhas e óleo de sementes, em coelhos normais e com diabetes induzido por aloxano. Além disso, oferece proteção contra necrose hepática induzida por paracetamol em ratos, reduzindo os níveis de aspartato aminotransferase sérica (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamil transpeptidase (GGT), indicativos de danos hepáticos.

Hussain (2002) demonstrou que o tratamento aquoso do Neem tem efeito favorável sobre a glicemia e tolerância à glicose, como também reduziu os lipídios séricos, o peso corporal e reverteu completamente as anormalidades da retina e a inflamação das patas dos animais. Yanpallewar et al. (2003) relataram que o suco fresco de folhas frescas de *Azadirachta indica* inibiu a peroxidação lipídica e preveniu a depleção de grupos sulfidríla nas células hepáticas induzidos por paracetamol.

O pré-tratamento com *Azadirachta indica* estabilizou os níveis séricos de aspartato transaminase, alanina transaminase e fosfatase alcalina, que aumentam

após administração de paracetamol. As observações histopatológicas dos tecidos do fígado corroboraram esses achados. Segundo Kale et al. (2003), o extrato aquoso das folhas de *Azadirachta indica* previne e reverte o dano hepatotóxico induzido por drogas antituberculares em ratos, diminuindo significativamente as mudanças nos níveis séricos de bilirrubina, proteína, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina, assim como as mudanças histológicas do órgão. Negri *apud* Chattopadhyay⁶ (1999) entendeu que o efeito hipoglicemiante do extrato das folhas de *Azadirachta indica* deve-se ao bloqueio do efeito inibitório da serotonina, sobre a liberação de insulina mediada pela glicose. Chattopadhyay; Bandyopadhyay (2005), descreveram que a administração do extrato de folhas de *Azadirachta indica* aumentou significativamente o nível hepático de enzimas dependentes de glutatona e da atividade da superóxido dismutase e catalase, sugerindo que o efeito hepatoprotetor do extrato sobre a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol deve-se à essa atividade antioxidante.

O *diabetes mellitus* é um distúrbio metabólico crônico, caracterizado por níveis elevados de glicemia pela deficiência e/ou resistência à insulina, que afeta aproximadamente 3% da população mundial e a torna umas das doenças não contagiosas mais comuns. A hiperglicemia ocorre devido ao débito hepático alterado de glicose e à captação diminuída de glicose pelo músculo esquelético com síntese reduzida de glicogênio. Quando a reabsorção renal de glicose ultrapassa o seu limiar ocorre glicosúria, causando uma diurese osmótica que leva à poliúria e polidipsia. A morbidade associada ao diabetes de longa duração decorre de várias complicações graves, como distúrbios macrovasculares, microangiopatia, retinopatia, nefropatia e neuropatia. A hipertensão coexistente leva à lesão renal progressiva, portanto o seu tratamento diminui a evolução da nefropatia diabética (RANG et al., 2004). A maior parte das evidências experimentais e clínicas disponíveis sugere que as complicações representam uma consequência dos distúrbios metabólicos, principalmente da hiperglicemia. Em virtude disso, estudos envolvendo substâncias com ação hipoglicemiante tornam-se imprescindíveis na tentativa de proporcionar maior conforto ao doente diabético.

No que diz respeito à indução do *diabetes mellitus*, Furlan (2001) relatou que grande parte das alterações que aparecem após o tratamento com estreptozotocina são decorrentes da lesão tóxica da sobre as células β , ao se acumular nas porções centrais das ilhotas pancreáticas. Seus efeitos incluem hipergli-

⁶NEGRI, G. *Diabetes mellitus*: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.

cemia, aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário, o peso corporal dos animais tende a diminuir e lipemia. Negri (2005), sugeriu após revisão, que a estreptozotocina estimula a produção de radicais livres, o que leva a destruição e disjunção das células β . Este xenobiótico tem sido usado para induzir o diabetes com concomitante deficiência de insulina.

O primeiro conceito sobre Homeopatia data de 460-370 a.C. citada por Hipócrates, que utilizou a “Lei dos Semelhantes” em um dos seus aforismos: “O que produz a estrangúria, cura a estrangúria; o que causa o vômito, cura o vômito; o que dá febre a um homem são, cura um homem que tem febre”. A Homeopatia teve seu grande marco com Samuel Hahnemann (1755-1843), quando descobriu um processo terapêutico cujo fundamento era a correlação clínica da doença com o fenômeno da reação às drogas. A palavra Homeopatia, oriunda do grego *homoios* = semelhante e *pathos* = doença ou sofrimento, designa a ciência terapêutica baseada na lei natural de cura *Simila similibus curentur* ou “sejam os semelhantes curados pelos semelhantes”. Representa método que adapta à totalidade sintomática do doente uma substância capaz de provocar experimentalmente em indivíduos aparentemente saudáveis, porém sensíveis, um conjunto de alterações que permitem confronto de semelhança entre este estado de doença artificial e o estado de doença natural desenvolvido pelo doente.

Em definição de Demarque, o tratamento segundo a lei da semelhança está baseado no fato de toda substância capaz de produzir em doses ponderáveis, tóxicas, fisiológicas ou diluições imponderáveis, no indivíduo sadio, porém, sensível, um quadro mórbido subjetivo e eventualmente objetivo ou lesional, será igualmente capaz de, em doses convenientes conforme o caso, curar no indivíduo sensibilizado pela doença um quadro mórbido semelhante, excetuando as lesões irreversíveis. As doses mínimas ou infinitesimais se vincularam à lei da semelhança. O fato das diluições sucussionadas adquirirem poder dinâmico crescente fez com que os termos diluição, potência e dinamização passassem a ser indistintamente empregados sob o ponto de vista prático, pois não se admite em Homeopatia uma diluição que não esteja sistematicamente complementada por succussões, numa técnica padronizada, sendo a escala centesimal a única de exatidão matemática válida em trabalhos científicos. A descoberta do poder farmacodinâmico das doses mínimas tornou as doses ponderáveis desnecessárias, obsoletas e contra-indicadas. Dose mínima passou a representar um dos fundamentos do novo método, o mais polêmico até então (KOSSAK-ROMANACH, 2003).

A pesquisa sobre ultra alta diluições e a interação entre elas e os sistemas vivos alcançou tamanho nível de qualidade e popularidade que tem sido levada a sério pelas ciências ortodoxas atuais. Pelo termo ultra alta diluições, entenda-se soluções aquosas ou aquoso-alcoólicas, nas quais uma substância é diluída por meio de um processo especial em que a taxa de concentração do soluto para o solvente torna-se da ordem do número de Avogadro, ou, além disso, (ENDLER; SCHULTE, 1994). Nas preparações em ultra alta diluições (UHD), uma substância é diluída sequencialmente a 1:100 (C) e sofre succussão a cada passagem. A sigla CH (Centesimal Hahnemanianna) corresponde a uma diluição de 100 vezes e o número que a precede corresponde ao número de passagens (CARVALHO, 2000).

O conceito operacional do tratamento homeopático está ligado à indução de uma sutil interferência dentro de um organismo doente. Doses diluídas de uma substância, a qual em uma dose mais concentrada pode produzir efeitos que se assemelham a um conjunto característico de sintomas de uma doença ou distúrbio, são utilizadas para estimular um processo de autorrecuperação. Esta Lei da Semelhança implica que as substâncias que iniciaram os sintomas, quando aplicadas para sistemas biológicos saudáveis, podem tornar-se remédios para sintomas similares em sistemas biológicos doentes. Organismos intactos ou partes de organismos (órgãos, células, estruturas subcelulares) tem sido muito usados em pesquisa básica. O organismo mais comumente estudado para elucidar os efeitos terapêuticos de substâncias diluídas e potencializadas foi o rato (VAN WIJK; CLAUSEN; ALBRECHT, 2009). Em relação ao tratamento homeopático do *diabetes mellitus*, Santos (1990) verificou ação hipoglicemiante da aloxana em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (aloxana 6 CH) em ratos diabéticos. Rosa et al. (2010) relataram que ratos com *diabetes mellitus* induzida por estreptozotocina, quando tratados com estreptozotocina 6 CH mostraram, no 30º dia de tratamento, os menores níveis glicêmicos em relação aos grupos controle branco e diabético e aos animais que receberam extratos aquoso e hidroalcoólico de *Azadirachta indica*, A. Juss.

Quanto ao fígado, Lenk et al. (1992) notaram perda estrutural e da capacidade funcional do retículo endoplasmático rugoso do fígado de ratos com *diabetes mellitus* induzido pela estreptozotocina. Shen; Zhag; Kaufman, (2004) narraram que o estresse no retículo endoplasmático rugoso está relacionado com várias patologias, entre as quais o *diabetes mellitus*. Grinblat; Stoppani (1989) verificaram que a velocidade do

fluxo de cálcio foi significativamente maior nas mitocôndrias hepáticas de ratos normoglicêmicos, quando comparada a de animais hiperglicêmicos estreptozotocínicos. Vanhorebeek et al. (2005) observaram, em pacientes diabéticos tratados com insulina que foram a óbito, hepatócitos com mitocôndrias hipertróficas, com aumento no número de cristas irregulares e anormais, bem como redução da eletron densidade da matriz destas organelas. Kumar; Abbas; Fausto (2005) descreveram que no *diabetes mellitus* encontra-se glicogênio nas células epiteliais das porções distais dos túbulos contornados proximais e, às vezes, na porção descendente da alça de *Henle*, assim como nas células hepáticas, células β das ilhotas de *Langerhans* e nas fibras musculares cardíacas. O glicogênio é uma fonte de energia presente no citoplasma de disponibilidade imediata; e depósitos intracelulares de glicogênio em excesso são vistos em pacientes com anormalidade no metabolismo da glicose ou do glicogênio, como no *diabetes mellitus*.

Visto que o controle rigoroso da glicemia constitui até agora a única esperança de evitar as complicações fatais do *diabetes mellitus* (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000) alguns estudos têm sido realizados com substâncias de ação hipoglicemiante, provavelmente no sentido de recuperar a produção de insulina. Neste sentido, Bolkent et al. (2000) mostraram que a *Beta vulgaris L. var. cicla (chard)* pode diminuir a glicemia pelo aumento da secreção de insulina e regeneração das células β do pâncreas. Kaneto et al. (1999) evidenciaram o efeito dos antioxidantes N-acetil-L-cisteína (NAC) e vitaminas E e C sobre a preservação da função das células beta pelo aumento de sua massa beta nos ratos diabéticos tratados. Isso sugere supressão da apoptose dessas células.

No presente estudo, foram avaliados os efeitos do *diabetes mellitus* e de substâncias com ação hipoglicemiante sobre o fígado de ratos com a doença induzida por injeção de estreptozotocina, por meio de análise morfológica dos hepatócitos. Foram utilizadas, como substâncias hipoglicemiantes, os extratos aquoso e hidroalcoólico de *Azadirachta indica*, *A. Juss* e a estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH).

Material e Métodos

A planta *Azadirachta indica*, *A. Juss*, cultivada e fornecida pela EMBRAPA-CNPq, após ser coletada, foi estabilizada em estufa, com ar circulante, a 40°C, durante aproximadamente 72 horas e, posteriormente, foi finamente dividida e tamisada (tamis 40). Em seguida, foi armazenada em recipiente

plástico à temperatura ambiente. Para a preparação do extrato de origem vegetal, utilizaram-se folhas de *Azadirachta indica*, *A. Juss* (droga) dessecada e, como insumo inerte, água ou etanol 70% (V/V), em uma relação droga/insumo inerte de 1:10 (p/V) (10%), pelo processo de percolação. Na percolação, colocou-se a droga vegetal dessecada, finamente dividida e tamisada (tamis 40 ou 60). Adicionou-se o líquido extrator, em quantidade correspondente a 20% do peso da droga, para umedecer o pó, em recipiente adequado e bem vedado, deixando em contato por 4 horas. Transferiu-se para percolador de capacidade ideal e colocou-se volume suficiente de líquido extrator para obtenção da quantidade almejada de tintura. Deixou-se em contato por 24 horas e percolou-se, então, à velocidade de 8 gotas por minuto para cada 100g da droga. Prensou-se o resíduo (torta), misturou-se o líquido, assim obtido, com o percolado e adicionou-se, se for o caso, quantidade suficiente do líquido extrator (menstruo) para completar o volume. Deixou-se em repouso por 48 horas, filtrou-se e armazenou-se adequadamente. O líquido foi armazenado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor e da luz direta (FARMACOPÉIA, 1988). Com esta técnica preparou-se um extrato aquoso e um etanólico (70%) que foram utilizados nos grupos tratados.

Para a preparação de ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH) utilizou-se, como ponto de partida, estreptozotocina (Sigma) e como veículo, solução etanólica em diferentes concentrações (30% ou 70%). Realizou-se 100 sucussões pelo processo de diluição e sucussão mecânicas. A sucussão foi executada por intermédio de movimento contínuo e ritmado, no sentido vertical, de modo a produzir choque do fundo do frasco contra um anteparo semirrígido. Dispôs-se sobre a bancada 6 frascos de 30 mL para atingir a dinamização desejada e colocou-se em cada frasco 19,8mL de solução etanólica a 70% (V/V). Acrescentou-se no 1º frasco 0,2g de estreptozotocina, homogeneizou-se e sucussionou-se 100 vezes em braço mecânico. Obteve-se assim a 1 CH. Transferiu-se para o 2º frasco 0,2mL da 1 CH e sucussionou-se 100 vezes em braço mecânico. Obteve-se assim, a 2 CH. Transferiu-se para o 3º frasco 0,2mL da 2 CH e sucussionou-se 100 vezes em braço mecânico. Obteve-se assim a 3 CH. Procedeu-se de forma idêntica para as preparações subsequentes até atingir a dinamização desejada (6 CH). A preparação 6 CH foi feita em solução etanólica a 30% (V/V). O líquido obtido foi conservado em recipiente de vidro âmbar, bem fechado, protegido do calor e da luz direta (FARMACOPÉIA, 1988).

Para o experimento, foram utilizados 25 ratos machos (*Rattus norvegicus* variedade *Wistar*), pesando entre 200 e 250 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu – UNESP. Estes foram divididos em grupos de 5 animais, adaptados em gaiolas no Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP, com temperatura controlada e ciclo de claro-escuro de 12 horas, fornecimento de ração e água *ad libitum*, durante 5 dias.

Após o período de adaptação, os animais foram deixados em jejum alimentar de 14 a 16 horas e coletou-se, por meio da artéria infraorbitária, amostras de sangue (1mL) para a determinação da glicemia pelo método de King; Garner (1947), sob leve anestesia inalatória por éter. Em seguida, foi administrada a 20 ratos, 35 mg/kg de estreptozotocina diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,5), no seio venoso do pênis, com os animais ainda anestesiados. Os outros cinco ratos serviram como grupo controle branco. Após cinco dias, coletou-se sangue, como descrito anteriormente, para a determinação da glicemia. Os animais que apresentaram hiperglicemia foram separados em grupos que receberam tratamentos orais, uma vez por dia. Considerou-se o dia de detecção do *diabetes mellitus* como dia zero do experimento e os níveis glicêmicos foram mensurados posteriormente no 5º e 30º dia experimental.

Todos os animais foram tratados diariamente (0,2mL/100g de peso vivo), por meio de gavagem, da seguinte forma: os grupos controle branco e controle branco diabético receberam água; um grupo recebeu extrato aquoso de *Azadirachta indica*, *A. Juss* a 10%; outro grupo foi tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, *A. Juss* a 10% e o último grupo com estreptozotocina em ultra altas diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH). Este procedimento foi realizado durante 30 dias.

No 31º dia, os animais foram sacrificados e os fígados coletados foram fixados em solução de *Bouin* por 24 horas e processados, rotineiramente, para a inclusão em parafina. Após a microtomia semisseriada, a intervalos de 110µm, os cortes histológicos, à espessura de 7µm, foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (HE) e do ácido periódico de *Schiff* (PAS) (TOLOSA et al., 2003) e fotomicrografados com auxílio de um fotomicroscópio da LEICA DM 5000 B. Para cada animal foram confeccionadas cinco lâminas com cinco cortes histológicos, ou seja, 25 cortes por animal.

O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos

e 5 repetições (PIMENTEL GOMES, 2000).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Campus de Jaboticabal - SP, sob o protocolo 25471/05.

Resultados e Discussão

As características histológicas do fígado dos animais analisados estão ilustradas nas figuras de 1 a 5.

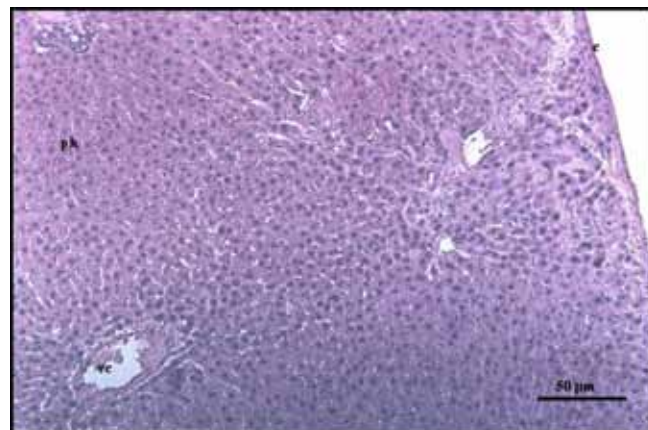


Figura 1: Fotomicrografia do fígado de rato macho albino *Wistar*, do grupo controle branco diabético, indicando: cápsula de tecido conjuntivo denso (c), parênquima hepático (ph) e veia centrolobulillar (vc). Hematoxilina – eosina, 10X.

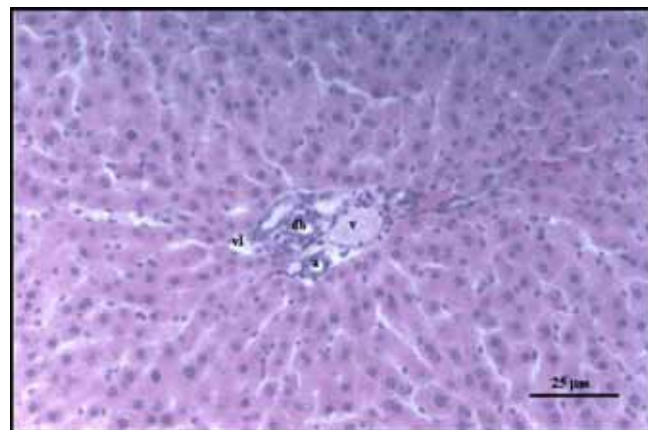


Figura 2: Fotomicrografia do fígado de rato macho albino *Wistar*, do grupo tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica*, *A. Juss* a 10%, indicando no espaço porta: arteríola (a), vênula (v), ducto bilífero (db) e vaso linfático (vl). Hematoxilina – eosina, 20X.

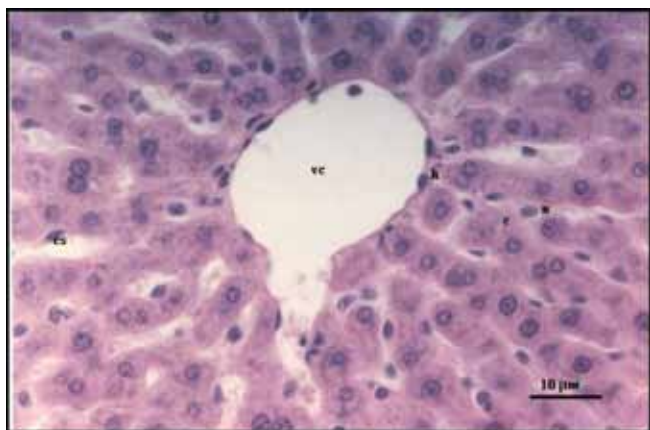


Figura 3: Fotomicrografia do fígado de rato macho albino *Wistar*, do grupo controle branco, indicando: veia centrolobular (vc), hepatócito (h) com núcleo (n) e citoplasma (c) e capilar sinusóide (cs). Hematoxilina – eosina, 40X.

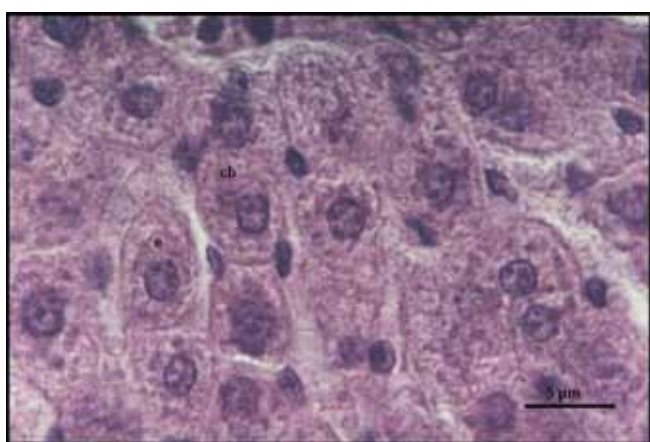


Figura 4: Fotomicrografia do fígado de rato macho albino *Wistar*, do grupo tratado com estreptozotocina 6CH, indicando no citoplasma: eosinofilia (e), devido à numerosas mitocôndrias, e corpos basofílicos (cb) correspondentes ao retículo endoplasmático rugoso. Hematoxilina – eosina, 100X.

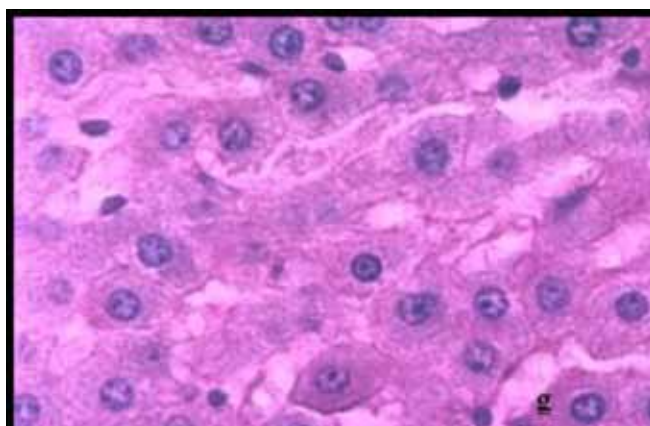


Figura 5: Fotomicrografia do fígado de rato macho albino *Wistar*, do grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *Azadirachta indica*, *A. Juss* a 10%, indicando: grânulos de glicogênio (g) corados em magenta no citoplasma dos hepatócitos e núcleo (n) contra-corado em azul. PAS/Hematoxilina, 40X.

Todos os animais, de todos os grupos experimentais, apresentaram características morfológicas normais para o órgão em questão. Com alusão ao estroma de sustentação do fígado (figura 1) verificou-se

que este órgão mostrou-se envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, a cápsula de *Glisson*. Os lóbulos estavam separados indistintamente, à semelhança dos relatos de Bacha Jr.; Bacha (2003). Observou-se, ainda, que no parênquima hepático, os hepatócitos estavam dispostos radialmente no lóbulo hepático conforme as descrições de Junqueira; Carneiro (2008).

Em relação à estrutura do espaço porta do fígado dos animais pertencentes a todos os grupos experimentais (figura 2) verificou-se a presença de artéria, vênula, vaso linfático e ducto bilífero apoiados em tecido conjuntivo denso, conforme as descrições de Junqueira; Carneiro (2008). Mediante este aspecto histológico normal do espaço porta, subentende-se que, no período de tempo estudado, o *diabetes mellitus* não danificou as circulações sanguínea e linfática, bem como a drenagem de bile.

Com referência à arquitetura dos hepatócitos, capilares sinusóides e veia centrolobular (figura 3) evidenciou-se que estas células formavam placas celulares direcionadas da periferia do lóbulo para o seu centro e anastomosavam-se livremente, deixando um espaço entre elas que estava ocupado pelos capilares sinusóides, que conferem o aspecto sinuoso chamado de “labirinto hepático” refletindo as narrações de Junqueira; Carneiro (2008). Estas observações possibilitam imaginar que o *diabetes mellitus*, nos primeiros 30 dias de indução desta patologia, não alterou a arquitetura estrutural do lóbulo hepático.

No que diz respeito à coloração do citoplasma dos hepatócitos pela Hematoxilina/Eosina os resultados encontrados, neste estudo (figura 4), foram semelhantes às descrições de Junqueira; Carneiro (2008), no que tange à coloração e, supostamente, funções desempenhadas pelas organelas. Assim, verificou-se que estas células apresentaram basofilia citoplasmática formando agregados dispersos, convencionalmente denominados corpos basofílicos, que são correspondentes ao retículo endoplasmático rugoso. Estas células também mostraram eosinofilia, principalmente, devido ao grande número de mitocôndrias e algum retículo endoplasmático liso. Desta forma, é plausível aventar a hipótese de que o *diabetes mellitus* não afetou as organelas acima mencionadas, durante o período experimental; havendo, portanto, a necessidade de estudos duradouros e ulteriores, em casos desta patologia, haja vista que, valendo-se de microscopia eletrônica de transmissão, Corrêa (1988), Lenk et al. (1992) e Shen et al. (2004) detectaram alterações no retículo endoplasmático rugoso e Grinblat e Stoppani (1989) e Vanhorebeek et al. (2005) em mitocôndrias.

Fazendo-se menção ao glicogênio hepático (figura 5), a análise histológica revelou que nos animais, ora aqui estudados, os hepatócitos evidenciaram afinidade tintorial ao método histoquímico do PAS (*Periodic Acid Schiff*) / Hematoxilina, a qual detectou no citoplasma destas células a presença de glicogênio que, por ser polissacarídeo, corou-se de magenta e os núcleos celulares foram contraincolorados de azul pela hematoxilina. Estes resultados, aliados ao aspecto histológico normal dos hepatócitos, estão de acordo com Junqueira; Carneiro (2008), que descreveram a síntese de glicogênio a partir de glicose, como função normal destas células. O aparecimento deste polissacarídeo no citoplasma do hepatócito se respalda, ainda, em Kumar et al. (2005), ao relatarem que nessa doença encontra-se glicogênio nas células hepáticas, além de outras células do organismo.

Somente com a análise morfológica do órgão, não foi possível confirmar os relatos de Biswas et al. (2002), Yanpallewar et al. (2003), Kale et al. (2003) e Chattopadhyay et al. (2005) quanto à prevenção de lesões hepáticas pelos extratos da *Azadirachta indica*, já que nenhum dos grupos, incluindo o grupo controle branco diabético, apresentou sinais de distúrbios hepatocelulares. Possivelmente, se o tempo experimental fosse estendido, seria possível detectar diferenças morfológicas entre os grupos, pois como o fígado é um órgão com alta capacidade de regeneração, as lesões causadas pelo *diabetes mellitus*, assim como os efeitos das substâncias testadas, talvez só sejam passíveis de serem observadas à microscopia de luz após certa cronicidade da doença. Da mesma forma, não se pode confirmar que o uso da estreptozotocina 6 CH tenha tido algum efeito protetor ou curativo sobre o fígado dos animais diabéticos, como era de se esperar, considerando os relatos de Santos (1990) e Rosa (2010), pelos mesmos motivos acima citados.

Conclusões

A análise histológica dos hepatócitos, mediante a coloração por hematoxilina e eosina, revelou que o *diabetes mellitus* não alterou a estrutura destas células durante os 30 dias de período experimental, assim como não afetou a síntese e o armazenamento de glicogênio hepático, fato este evidenciado pela coloração por PAS/Hematoxilina. Não foram detectadas diferenças morfológicas entre os grupos experimentais analisados, indicando que as substâncias hipoglicemiantes administradas também não exerceram nenhum efeito maléfico sobre o fígado dos animais, porém não foi possível, apenas com a análise

morfológica sob microscopia de luz, detectar algum benefício do uso destas substâncias neste órgão.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro concedido pela FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por meio de bolsa de Iniciação Científica.

Referências

- ALAM, M. M.; SIDDIQUI, M. B.; HUSSAIN, W. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. **Fitoterapia**, v. 61, n. 3, p. 240-242, 1990.
- BACHA JUNIOR, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003.
- BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002.
- BOLKENT, S. et al. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic β cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 251-259, 2000.
- CARVALHO, A. C. **Efeitos da administração da arnica montana (tintura-mãe e preparações UHD) na atividade de diferentes agentes flogísticos em ratos**. 2000. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista, São Paulo, 2000.
- CHATTOPAHYAY, R. R. Comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 3, p. 367-372, 1999.
- CHATTOPADHYAY, R. R.; BANDYOPADHYAY, M. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract against paracetamol-induced hepatic damage in rats: part III. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, p. 184-185, 2005.
- CHOPRA, R. N. The Nim (*Melia azadirachta* L. Meliaceae) In: CHOPRA, R. N. **Indigenous drugs of India**. 2. ed. Nova Delhi: Academia Publishers, 1958.
- CORRÊA, M. S. N. P. **Alterações induzidas pelo diabetes insulino-dependentes na glândula**

- submandibular do rato**. 1988. 239 f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Robbins**: patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Edunesp, 1996.
- DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- ENDLER, P. C.; SCHULTE, J. **Ultra high dilution**: physiology and physics. London: Kluwe Academic Publishers, 1994.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Generalidades e métodos de análise. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 1988. Parte 1 (v. 2. 5; v. 2. 6; v. 2. 8).
- FURLAN, M. M. D. P. A estreptozotocina como agente diabetogênico. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama, v. 5, n. 2, p. 197-201, 2001.
- GRINBLAT, L.; STOPPANI, A. O. M. Diabetes and calcium transportation in liver mitochondria. **Medicina**, v. 49, n. 1, p. 21-27, 1989.
- HUSSAIN, H. E. M. A. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica*, *A. Juss* (L.). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 17, n. 2, p. 115-123, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**: texto e atlas. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KALE, B. P. et al. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 35, p. 177-180, 2003.
- KANETO, H. et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. **Diabetes**, v. 48, n. 12, p. 2398-2406, 1999.
- KHOSLA, P. et al. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica*, *A. Juss* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 69-74, 2000.
- KING, E. J.; GARNER, R. J. Colorimetric determination of glucose. **Journal of Clinical Pathology**, v. 1, n. 1, p. 30-33, 1947.
- KOCH, C. K. **El arbor de la India (Azadirachta indica) y su utilización potencial en el Ecuador con especial referencia a las propiedades plaguicidas de sus extratos**. Equador: Convênio GTZ/MAG. 1990.
- KOSSAK-ROMANACH, A. **Homeopatia em 1000 conceitos**. 3. ed. São Paulo: Elcid, 2003.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robins e Cotran**: patologia – bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- LENK, S. E. et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes on rough endoplasmic reticulum and lysosomes of rat liver. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 263, p. E856- E862, 1992.
- MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: Imprensa Universitária - UFV, 1998.
- NEGRI, G. *Diabetes mellitus*: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.
- PARSHAD, O.; WEST, E.; GARDNER, M. Effects of aqueous extract of Neem (*Azadirachta indica*, *A. Juss*) on streptozotocin induced diabetic rats. In: ANNUAL RESEARCH CONFERENCE, 8., 1999, Kingston. **Proceedings...** Mona: University of the West Indies, Faculty of Medical Sciences, 1999.
- PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14. ed. Piracicaba: Pimentel Gomes, 2000.
- RAGASA, C. Y. et al. Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*, *A. Juss*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 555-558, 1997.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5. ed. Rio de

Janeiro: Elsevier, 2004.

ROSA, M. F. et al. Determinação da ação hipoglicemiante da *Azadirachta indica*, A. Juss (Neem) aclimatada no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, 2010.

SANTOS, E. Action hypoglycémiant de l'alloxane 6CH sur les rats diabétiques alloxaniques. **Homeopathie**, v. 3, p. 38-39, 1990.

SAXENA, R. C. Scope of Nim developing countries. **Paper Presented at World Nim Conference Souvenir**, Bangalore, p. 30-36, 1993.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the Nim tree (*Azadirachta indica*). **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-297, 1990.

SHEN, X.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response: a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, p. 79-92, 2004.

TOLOSA, E. M. C. et al. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003.

VANHOREBEEK, I. et al. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. **The Lancet**, v. 365, n. 9453, p. 53-59, 2005.

VAN WIJK, R.; CLAUSEN, J.; ALBRECHT, H. The rat in basic therapeutic research in homeopathy. **Homeopathy**, v. 98, p. 280-286, 2009.

YANPALLEWAR, S. U. et al. Effect of *Azadirachta indica* on paracetamol-induced hepatic damage in albino rats. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 391-396, 2003.

Recebido em: 29/12/2010

Aceito em: 16/03/2011

Received on: 29/12/2010

Accepted on: 16/03/2011