

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* com base na morfometria das células hipocâmpais de ratos diabéticos

Larissa Fernandes Garcia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS DO PONTAL
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Efeito neuroprotetor do extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* com base na morfometria das células hipocâmpais de ratos diabéticos

Larissa Fernandes Garcia

Dr.^a Luciana Karen Calábria

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ituiutaba - MG

Julho - 2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo me protegendo e me dando forças e coragem, permitindo que tudo que eu alcancei tenha sido possível. Por todos os momentos que eu não tive forças para continuar e Ele restaurou a minha fé e me deu o amparo que eu precisava pra seguir em frente.

À minha mãe, Tatiana Pereira Fernandes, por ser minha maior inspiração e por nunca medir esforços para me dar todo o suporte necessário pra que eu alcançasse os meus sonhos. Muito obrigada por depositar tanta confiança em mim e “fazer das tripas coração” pra me dar sempre o melhor, e mesmo quando eu não merecia você nunca me virou as costas. Você me ensinou que nada é impossível para quem tem força de vontade, e hoje tudo que consegui foi porque segui isso.

À minha avó, Eva Pereira Fernandes, por nunca ter deixado, nem por um minuto, de acreditar em mim e no meu potencial mesmo quando ninguém mais, inclusive eu mesma, acreditava. Por ter acompanhado cada passo meu e estar sempre do meu lado, torcendo por mim e fazendo tudo que cabe ao seu alcance pra me ajudar em qualquer mínima coisa. Obrigada por sempre me apoiar independente de qualquer coisa.

À minha professora e orientadora Luciana Karen Calábria, que me deu a oportunidade de “nascer” na ciência e com amor me proporcionar a formação inicial como pesquisadora, que acreditou na minha capacidade e me transmitiu tanto conhecimento desde aulas à vida acadêmica como um todo. Eu certamente amadureci muito sob a sua orientação, obrigada por ter tido tanta paciência e compreensão comigo em todos os meus lentos passos, e me ajudar a conseguir oportunidades para além da graduação que puderam me agregar tanto como pessoa quanto profissional. Garanto que todas as minhas conquistas daqui para adiante terão grande mérito seu, e sou muito grata por ter tido essa oportunidade em trabalhar com alguém tão especial e competente quanto você. Muito obrigada por ter sido minha mãe científica, por ter dedicado seu tempo e investido esforços na minha orientação neste trabalho. Eu espero poder retribuir e nunca te decepcionar. Saiba que você é uma grande inspiração pra mim, e eu quero poder um dia ser um pouquinho da grandeza que você representa pra mim.

À professora Gabriela Lícia Santos Ferreira, por ter sido uma mãe pra mim quando eu mais precisei. Eu devo muito a você e sou muito grata por ter conhecido uma pessoa tão maravilhosa no meu caminho, pois sem você, nada disso hoje estaria acontecendo. Obrigada por ter me ajudado a seguir meu sonho de continuar na universidade quando eu achei que tinha perdido essa chance, obrigada por ter me dado seu colo nos meus momentos de

desespero, obrigada por ter me disponibilizado seu tempo e suas técnicas histológicas pra me ensinar quanto à metodologia desta pesquisa, e obrigada principalmente por ter me inspirado e me mostrado com tanto amor e carinho a área mais linda da biologia a qual eu quero seguir como carreira acadêmica que é a Biologia Celular e Tecidual, fazendo eu me apaixonar tanto quanto você devido a sua tamanha compaixão e entusiasmo que contagia. Você foi, definitivamente, a pessoa que mais me ajudou durante todo o meu processo de adaptação na mudança de cidade e com a graduação, e eu sempre serei grata por ter te conhecido, obrigada por tudo que coube a mim dizer aqui e o que vai além, minha eterna gratidão!

Ao meu amor e fiel amigo, João Miguel Lula Cavalcante, por ter participado arduamente nesta minha caminhada e me mostrado que eu era capaz mesmo nas inúmeras vezes que pensei em desistir. Por ter me ajudado inúmeras vezes, seja na graduação ou na vida pessoal, e também por ter compreendido e suportado a distância. Muito obrigada por todo o incentivo, apoio, companheirismo, força e cumplicidade que foram essenciais para eu cumprir essa etapa tão importante na minha vida.

Aos meus melhores amigos, Mariana Garrido e Erick Mathäus, por transformar os meus dias mais pesados em leves, e acreditarem tanto em mim, me incentivando a ser uma pessoa cada vez melhor todos os dias devido às boas expectativas que vocês colocam em mim e me impulsionam a alcançar além dos meus objetivos. Obrigada por todo apoio, pela compreensão da minha ausência por tanto tempo, e por continuarem do meu lado sendo os melhores amigos que eu poderia ter.

À professora e amiga, Dr^a Karine Rezende de Oliveira, por ter sido uma das professoras mais especiais que eu pude conhecer durante a graduação. Que me fez encantar pela área da saúde, e que foi tão boa amiga e presente. Um dos maiores prazeres que eu pude ter durante essa minha jornada foi ter te conhecido e compartilhado bons momentos com você. Obrigada por ter me passado tantos ensinamentos para a vida e os aprendizados acadêmicos que mais fixei e gostei de aprender com suas aulas. Obrigada por ter me mostrado a graduação como uma coisa mais leve do que parece.

À minha grande amiga Ana Clara Monte, por ter auxiliado na execução deste trabalho com a revisão gramatical inglesa, e também por sempre estar ao meu lado e disponível pra tudo o que eu precisei, sendo uma amiga tão incrível e especial que eu quero levar para toda a vida!

Ao Prof. Dr. Alexandre A. A. de Rezende, por ter ajudado neste trabalho quando eu estava perdida, me orientando e direcionando o raciocínio que eu precisava seguir, me ensinando desde as disciplinas com muito carinho e dedicação. Obrigada por ter sido um dos

melhores professores que tive a oportunidade de aprender tanto, e sem a sua ajuda, a qualidade desse trabalho estaria comprometida. Sua resiliência e inteligência o tornam uma das minhas maiores inspirações acadêmicas.

Ao meu primo e parceiro, Rodrigo C. Fernandes, que me ajudou com a organização dos meus dados para a análise estatística deste trabalho e me ensinado a economizar esforços, me poupando um tempo que eu não tinha. Muito obrigada por se disponibilizar com tanto carinho e bondade a me ajudar mesmo com a sua rotina tão corrida quanto a minha. Obrigada pela maior ajuda que eu tive na execução deste trabalho em meio ao meu desespero me mantendo calma, e sem ela eu teria surtado com o tempo.

Ao meu grande amigo Felipe F. Naves, por ter caminhado e participado comigo durante minha trajetória na graduação, sendo um bom parceiro pra tudo e um amigo tão companheiro em muitos momentos importantes, se fazendo presente em me auxiliar com qualquer problema que eu tivesse inclusive para a execução dos gráficos e estatísticas deste estudo. Obrigada por participar neste trabalho indiretamente e pela amizade verdadeira nesses anos, que eu desejo que perdure pelo restante da vida!

Ao meu irmão “mais novo” de coração, Gustavo Siconello, por ter sido um companheiro tão fiel desde o começo da vida acadêmica e por ter sido o meu parceiro para tudo o que eu poderia contar, seja pessoal ou profissionalmente. Obrigada por tanto aprendizado compartilhado e pelas inúmeras trocas de experiências sobre a vida que você me permitiu ensinar e aprender. Você foi um grande amigo em todo esse processo, e enfrentar as pressões acadêmicas, com certeza, dividindo com você se tornou mais fácil.

À minha professora de biologia Sandra Oliveira, por ter me inspirado a seguir a área das Ciências Biológicas a qual eu criei um amor enorme. Você foi a pessoa que me mostrou esse campo e fez eu me apaixonar, e hoje estou seguindo a carreira de bióloga porque o meu maior estímulo foi você.

À toda minha família, que de alguma forma esteve sempre me apoiando e acreditando em mim mesmo de longe. Em especial à minha tia Poliana Fernandes (“tia Poli”) por sempre me lembrar do quanto sou amada e me dar muito carinho quando eu precisei. À minha irmãzinha Letícia Fernandes, por trazer alegria e graça aos meus dias com sua espontaneidade. E ao meu avô João, por ser tão importante e ter me ajudado e incentivado desde pequena com atividades de educação.

À todos os meus professores do Curso de Ciências Biológicas, que me transmitiram além de tamanho conhecimento, uma formação prazerosa de um ensino feito com amor, sendo

de fundamental importância para minha construção pessoal e profissional, me incentivando a ser cada vez melhor.

Aos demais amigos que participaram direta e indiretamente minha formação e construção como pessoa durante minha trajetória acadêmica e pessoal, em me ajudar a ser quem sou hoje e de alguma forma na execução deste trabalho, em especial meus amigos Victor Freire, Fernanda A. Graciano e Leonor Silva por terem sido as pessoas mais próximas a mim durante esse tempo, que acompanharam essa minha caminhada ao meu lado, obrigada pela companhia e amizade sincera, pelo apoio, e a troca de ensinamentos tão enriquecedora na minha experiência de vida.

Ao Campus Pontal e à Universidade Federal de Uberlândia, pela formação acadêmica e as oportunidades concedidas, por me surpreender e me fornecer muito além do subsídio necessário para me tornar uma profissional com qualidade.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela concessão e disponibilização das lâminas histológicas utilizadas neste estudo e consequente aprovação da condução deste projeto.

Aos animais que doaram a vida em prol deste estudo.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Muito obrigada!

Larissa Fernandes

APRESENTAÇÃO

O formato deste Trabalho de Conclusão de Curso cumpre as normas aprovadas pelo Curso de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal da Universidade Federal de Uberlândia.

Este trabalho foi redigido no formato de artigo científico, em português, respeitando as normas da Revista Horizonte Científico (Anexo 1), as quais podem ser acessadas no endereço eletrônico:

<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/about/submissions#authorGuidelines>.

O manuscrito representa o estudo na íntegra e será submetido para publicação somente após as considerações dos membros da banca de avaliação.

RESUMO

Diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica caracterizada pela hiperglicemia persistente que pode afetar o sistema nervoso central. Para diminuir os níveis de glicose sanguínea e tratar as complicações causadas pelo diabetes, a população tem feito o uso de extrato de plantas, tal como a *Pouteria ramiflora*. Esse estudo avaliou os efeitos do extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Pouteria ramiflora* na morfologia e morfometria das células hipocâmpais. Ratos machos foram divididos em grupos não diabéticos (n=6), diabéticos (n=6) e tratados por 20 dias (n=12) com acarbose 25 mg/kg ou extrato de *Pouteria ramiflora* 100 mg/kg e 500 mg/kg; e os cérebros foram dissecados. Secções coradas com Hematoxilina-Eosina foram preparadas e o diâmetro nuclear e a quantidade das células hipocâmpais foram analisadas pelo software ImageJ. A análise histológica revelou que o tratamento com o extrato da planta aumentou significativamente o número de células do hipocampo para ambos os grupos diabético e não-diabético. Contudo, quanto maior a concentração do extrato da planta (500 mg/kg), maior foi o diâmetro nuclear e a quantidade total de células para o grupo diabético em comparação ao tratado com acarbose. Em conclusão, observou-se que a administração de *Pouteria ramiflora* parece atenuar o dano cerebral causado pelo estresse oxidativo devido ao aumento no diâmetro nuclear das células ocasionado pelo tratamento, e também a perda neuronal. Portanto, sugere-se que o extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* tenha efeito neuroprotetor nas células do hipocampo de ratos diabéticos.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, Neuroproteção, Cérebro, Fitoterapia.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by a persistent hyperglycemia that may affect the central nervous system. To decrease blood glucose levels and to treat complications caused by diabetes, the population has been using plant extracts, such as *Pouteria ramiflora*. This study evaluated the effects of hydroalcoholic extract from the stem of *Pouteria ramiflora* on the morphology and morphometry of hippocampal cells. Male rats were divided into non-diabetics ($n=6$), diabetics ($n=6$), and treated for 20 days ($n=12$) with acarbose 25 mg/kg or *Pouteria ramiflora* extract 100 mg/kg and 500 mg/kg; and the brains were dissected. Sections stained with Hematoxylin-Eosin were prepared and the nuclear diameter of hippocampal cells was analyzed by ImageJ software. The histological analysis revealed that treatment with plant extract had significant increases in the number of cells of the hippocampus for both diabetic and non-diabetic groups. However, as the higher the concentration of the plant extract (500 mg/kg), the greater was the increase in the nuclear diameter and the number of total cells for the diabetic group in comparison with acarbose treatment. In conclusion, administration of *Pouteria ramiflora* seems to attenuate the brain damage caused by oxidative stress due to the increase in the nuclear diameter of the cells caused by the treatment, also the neuronal loss. Therefore, it is suggested that the extract of *Pouteria ramiflora* stem bark has a neuroprotective effect on the hippocampal cells of diabetic rats.

Keywords: Diabetes mellitus, Neuroprotective, Brain, Phytoterapy.

SUMÁRIO

Introdução.....	11
Material e Métodos.....	13
Resultados e Discussão.....	15
Conclusão.....	19
Referências.....	20
ANEXO 1.....	23

INTRODUÇÃO

Um dos fatores que diferencia o cérebro dos demais órgãos é seu alto consumo energético à custa exclusivamente de glicose com a ausência de qualquer tipo de reserva energética nas células. A glicose é essencial, porém, quando em excesso, pode trazer várias complicações para o sistema nervoso central, incluindo alterações na neurotransmissão, mudanças estruturais, distúrbios na aprendizagem e memória, e anormalidades eletrofisiológicas (Mooradian, 1988; Mccall, 1992; Biessels et al., 1994; Di Mario et al., 1995; Helkala et al., 1995).

O diabetes mellitus é uma condição crônica que ocorre quando há níveis elevados de glicose livre no sangue por deficiências na produção de insulina, ou em sua ação ou em ambos e a hiperglicemia se torna crônica e persistente, seja por destruição das células beta do pâncreas, ou pela resistência dos tecidos periféricos à ação da insulina. A longo prazo, quando não controlada, a hiperglicemia pode causar danos a vários órgãos do corpo, incluindo o cérebro (IDF, 2017, SBD, 2017). Assim, além de controlar a glicemia, a insulina atua na modulação cognitiva do sistema nervoso central, na memória, no aprendizado e na plasticidade sináptica (Zhao et al., 1999; Park, 2001). Neste sentido, é possível que o hipocampo, uma estrutura cortical envolvida na formação da memória (Lopes et al., 1999), também seja afetado por esta complicação metabólica.

A amilase é responsável por catalizar a hidrólise inicial de amidos complexos e glicogênio em oligossacarídeos menores no lúmen do intestino delgado, enquanto as alfa-glicosidases intestinais hidrolizam oligossacarídeos, trissacarídeos e dissacarídeos em glicose e outros monossacarídeos na borda em escova do intestino delgado, promovendo sua absorção e digestão (Rosa; Dias, 2014, Sales 2012). No portador de diabetes mellitus, a degradação do amido leva ao aumento de glicose livre circulante e que não é utilizada pelas células, seja pela falta de insulina ou pela deficiência na sua função, logo, a inibição dessas enzimas, resulta em uma absorção de glicose lenta e uma diminuição da glicemia pós-prandial (Rosa; Dias, 2014).

Atualmente, alguns dos fármacos inibidores dessas enzimas amplamente utilizados pela população diabética incluem acarbose, miglitol e voglibose (Souza, 2011). A Acarbose é um oligossacarídeo complexo que foi isolado de cultura de cultivo de diversos gêneros de actinomyces, e pertence a uma classe de agentes antidiabéticos orais, atua retardando a digestão de carboidratos (oligossacarídeos e dissacarídeos) em monossacarídeos passíveis de serem absorvidos pela borda em escova do intestino (Clissold; Edwards, 1988, Balfour; Mctavish, 1993). No entanto, têm sido reportados diversos efeitos colaterais relacionados ao

uso da acarbose em pacientes dose-dependentes, tais como desconforto abdominal, anorexia, gases, diarreia, dentre outras implicações gastro-intestinais (Cheng, 2005).

A demanda por fármacos seguros, hipoglicêmicos e antidiabéticos leva ao interesse por inibidores naturais de origem vegetal, que têm mostrado efeitos inibitórios contra a atividade das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase e, portanto, podem ser potenciais terapêuticos eficazes no controle da hiperglicemia e com mínimos efeitos colaterais (Souza et al., 2012). Nos países em desenvolvimento, onde uma parte significativa da população não tem acesso a medicamentos e ao tratamento adequado, as pessoas buscam em plantas de conhecimento popular uma forma alternativa de tratar as doenças e seus sintomas.

Algumas plantas têm revelado capacidade de diminuir a atividade da alfa-amilase, como é o caso da *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk da família Sapotaceae, cujo potencial de inibição foi verificado em 75% a partir de testes *in vitro* demonstrado por De Gouveia e colaboradores (2013). Contudo, com a inibição desta enzima é possível que a hiperglicemia seja controlada, mas há poucos estudos que demonstram a diminuição também dos efeitos secundários do diabetes mellitus diretamente nos órgãos, apesar de Da Costa e colaboradores (2013) já terem revelado o efeito neuroprotetor do extrato das folhas de *Pouteria ramiflora*, prevenindo alterações neuronais no hipocampo do cérebro de ratos diabéticos.

Na prática popular, tanto as folhas quanto a casca do caule e da raiz da *Pouteria ramiflora* são utilizadas no tratamento do diabetes mellitus. Contudo, estudos ainda não foram realizados para elucidar os mecanismos de ação ou os efeitos na morfologia dos diferentes órgãos. Neste sentido, o presente estudo visou investigar os efeitos do tratamento com o extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* na morfologia do hipocampo de cérebro de ratos diabéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e preparo do material vegetal

O material vegetal (casca do caule de *Pouteria ramiflora*) foi coletado na Reserva Caça & Pesca Itororó, no município de Uberlândia-MG e em seguida foi submetido a identificação botânica por especialista, por autorização do IBAMA 02001.003400/2009-39. Excicatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Biologia da UFU sob o n° HUFU 45.535. O material vegetal foi separado, dessecado em estufa de ventilação forçada a 30-40°C e pulverizado em moinho de facas. O extrato hidroetanólico 1:1 foi preparado por maceração exaustiva por 24 horas, seguida de centrifugação e liofilização (Moura, 2008).

Animais e procedimentos experimentais

Ratos Wistar machos de massa corpórea entre 200 e 250g foram aclimatizados em gaiolas sob controle de iluminação (claro/escuro), temperatura e umidade ambiente, com livre acesso a água e ração. Os experimentos animais foram realizados no Centro de Bioterismo e Experimentação da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com a autorização do CBEA/UFU e da aprovação pelo comitê de ética em uso de animais CEUA/UFU (registro CEUA/UFU 060/10 e 054/09).

O diabetes mellitus foi induzido pela administração via veia peniana de 40 mg/Kg de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato 0.05 M (pH 4.5). Os ratos com nível glicêmico menor que 200 mg/dL foram considerados diabéticos e distribuídos em grupos de 12 animais, separadamente, considerando grupo não-diabético e grupo diabético, tratados com acarbose (25 mg/kg) e tratados com o extrato de *Pouteria ramiflora* nas concentrações de 100 e 500 mg/Kg.

O extrato foi diluído em água destilada e administrado no período da tarde por gavagem durante 20 dias. O peso corporal e os níveis glicêmicos foram monitorados periodicamente. Ao final do experimento, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e, após anestesia com solução de xilasina (10mg/Kg) e cetamina (75mg/Kg) aplicada via intraperitoneal, o animal foi sacrificado por decapitação, o cérebro foi dissecado e imediatamente lavado em salina (NaCl 0.9%), sendo fixado em formaldeído 10% por 24 horas e, posteriormente, submetido aos procedimentos de desidratação em uma bateria gradiente de álcool etílico, diafanizado em xilol e emblocado em parafina líquida, à 56°C na estufa. Cortes de 5 µm foram montados em lâmina pré-tratada com gelatina 0,2%.

Análise morfológica

Os cortes foram desparafinizados em estufa a 60° por 20 minutos seguidos por banhos de xilol, bateria gradiente de álcool etílico (100%, 70%, 50%) e água destilada, por 5 minutos em cada. Após a hidratação, as secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H.E.), na qual os cortes foram imersos em solução de Hematoxilina de Harris comercial por 10 minutos e lavados em água corrente por 15 minutos. Em seguida, foram imersos em solução de Eosina amarelada por 10 minutos e posteriormente imersos por 5 minutos em água destilada. Uma vez corados, os cortes foram desidratados, seguindo a bateria gradiente (50%, 70%, 100%) de álcool etílico e xilol por 5 minutos em cada. As lâminas foram montadas com Entelan e lamínula, os cortes foram visualizados em microscópio de luz Bio Focus e as imagens foram capturadas e armazenadas em arquivo do tipo “jpeg” por meio de um tablet associado ao software VMS3.6, versão 1.0. Para cada corte, entre 40 e 50 fotomicrografias foram obtidas de forma randomizada com objetiva de 40x. A partir das imagens digitalizadas foi realizada a morfometria com o uso do software ImageJ.

Para a análise de morfometria as células viáveis foram contadas manualmente (n) por meio de seleção, assim como a medição das áreas analisadas. O diâmetro nuclear (μm) foi calculado traçando uma linha horizontal a partir de um ponto até o outro oposto ao primeiro, e uma linha vertical também a partir de um ponto até o outro oposto cruzando a linha horizontal no meio, considerando um campo para todas as regiões, sendo os valores obtidos multiplicados entre si.

Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando o software BioEstat, aplicando teste One Way ANOVA com *post hoc* Tukey test para comparar os grupos antes e após o tratamento. Apenas os valores de $p < 0,01$ foram considerados significantes. O gráfico foi obtido pelo software Graphpad Prism versão 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hiperglicemia persistente é o principal fator que caracteriza o diabetes mellitus como desordem metabólica, a qual é causada por uma relativa ou absoluta deficiência de insulina. A hiperglicemia leva ao estresse oxidativo, às alterações em enzimas metabólicas, à glicosilação protéica e à graves alterações estruturais em tecidos e órgãos vitais (Naik et al., 2014). O sistema nervoso central é um dos órgãos mais vulneráveis afetado pelo estresse oxidativo associado ao diabetes mellitus, devido à geração excessiva de radicais livres a partir da oxidação de níveis elevados de glicose intracelular (Ibrahim, 2017; Calábria et al., 2013). Esse estresse oxidativo pode ativar a apoptose celular, alterando a transmissão sináptica, sendo um mecanismo de neurotoxicidade da glicose (Artola, 2008; Tomlinson; Gardiner, 2008).

A utilização de coloração H.E. em estudos experimentais para morfometria celular é comumente utilizada (Moreira et al., 2011; Wollmann et al., 2011; Seabra et al., 2012; da Costa et al., 2013). Neste estudo, cortes frontais de cérebro de rato foram corados pela técnica H.E. e analisados por morfometria, a fim de quantificar e mensurar o diâmetro das células nervosas do hipocampo, avaliando o efeito do diabetes mellitus e o tratamento com acarbose (25 mg/kg) e com extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora* nas concentrações de 100 e 500 mg/kg.

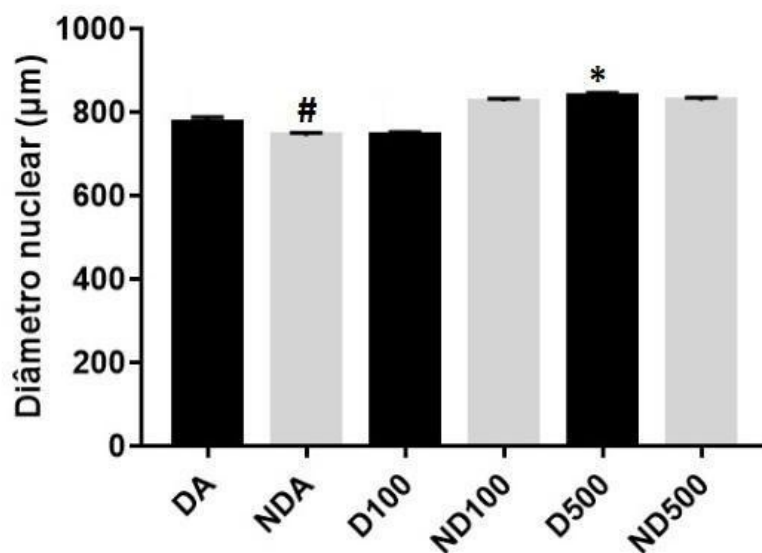
Tabela 1: Dados morfométricos do hipocampo de ratos diabéticos e não-diabéticos tratados com acarbose e com extrato da casca do caule de *Pouteria ramiflora*

Variáveis	<i>DA</i>	<i>D100</i>	<i>D500</i>	<i>NDA</i>	<i>ND100</i>	<i>ND500</i>
Células hipocampais (n)	2.217	2.484	3.066	2.381	4.129	3.480
Diâmetro nuclear ($\mu\text{m} \pm \text{EP}$)	775 \pm 0,41	743 \pm 0,31	836 \pm 0,30*	743 \pm 0,36#	826 \pm 0,42	827 \pm 0,37

Grupos: **DA** (diabético tratado com acarbose a 25 mg/kg); **D100** (diabético tratado com extrato de *Pouteria ramiflora* a 100 mg/kg); **D500** (diabético tratado com extrato de *Pouteria ramiflora* a 500 mg/kg); **NA** (não-diabético tratado com acarbose a 25 mg/kg); **N100** (não-diabético tratado com extrato de *Pouteria ramiflora* a 100 mg/kg); **ND500** (não-diabético tratado com extrato de *Pouteria ramiflora* a 500 mg/kg). Os números de células hipocampais referem-se à contabilização geral da quantidade de células de todo o hipocampo. As médias do diâmetro nuclear são apresentadas como média (em μm) \pm EP. (*) $p < 0,01$ comparando o grupo D500 com DA e D100; (#) NDA com N100 e N500.

O termo “hipocampo” é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões interligadas: o giro denteado e o hipocampo propriamente dito ou “Corno de Amon” (CA). Nelas podem-se encontrar dois tipos de células principais, as células granulares do giro denteado e as células piramidais das sub-regiões CA1, CA2 e CA3 (Tavares, 2006; da Silva, 2007). Os dados morfométricos nos cortes de cérebro de ratos diabéticos e não-diabéticos foram realizados considerando o número total de células no hipocampo e a média do diâmetro nuclear destas células nas sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado (Tabela 1).

Figura 1: Diâmetro nuclear das células do hipocampo, incluindo as sub-regiões CA1, CA2, CA3 e giro denteado de ratos diabéticos e não-diabéticos tratados com acarbose 25 mg/kg (DA; NDA) e com extrato de *Pouteria ramiflora* nas concentrações de 100 mg/kg (D100; ND100) e 500 mg/kg (D500; ND500). (*) $p < 0,001$ comparando o grupo D500 com o DA e D100; (#) NDA com N100 e N500



A análise estatística revelou aumento gradativo no número de células em todas as áreas do hipocampo, conforme aumenta-se a concentração do extrato da planta nos animais diabéticos tratados e ainda maior nos animais não diabéticos tratados, comparando-se com o tratamento com acarbose. Para os diabéticos, o menor número de células foi observado em ratos tratados com acarbose (2.217 células) e o maior número em ratos tratados com o extrato de *Pouteria ramiflora* a 500 mg/kg (3.066 células). Para os não-diabéticos, o menor número de células também foi observado em ratos tratados com acarbose (2.381 células) e o maior número em ratos tratados com o extrato de *Pouteria ramiflora* a 100 mg/kg (4.129 células) (Tabela 1; Figura 1). Em contrapartida, a análise do diâmetro nuclear apontou diminuição nas

células hipocâmpais para os ratos diabéticos comparando os tratamentos da acarbose com o extrato de *Pouteria ramiflora* a 100 mg/kg, e aumento ao ser comparado com a dose mais alta do extrato da planta ($p < 0,01$). Para os ratos não-diabéticos, o diâmetro nuclear aumentou comparando os tratamentos com acarbose e o extrato de *Pouteria ramiflora* nas duas concentrações testadas ($p < 0,01$), mantendo-se constante independente da dose (Tabela 1; Figura 1). Esse aumento na densidade de células hipocâmpais também foi constatado em estudo com ratos Wistar epilépticos avaliando a ação antioxidante e o efeito neuroprotetor de ácido clorogênico (González, 2016).

Considerando o diabetes mellitus como alvo de estudo, não há diferença significativa entre os grupos diabético e não-diabético, pelo menos em relação ao número de células e diâmetro celular (Tabela 1; Figura 1). Por outro lado, quando a avaliação é direcionada aos tratamentos, observa-se que somente a alta concentração de extrato da planta promove aumento no diâmetro nuclear das células hipocâmpais em diabéticos. Diferentemente dos indivíduos não-diabéticos que, independente da concentração (100 ou 500 mg/kg) do extrato de *Pouteria ramiflora* apresentaram aumento significativo no diâmetro nuclear das células hipocâmpais (Tabela 1; Figura 1).

Dentre os diferentes fármacos terapêuticos para o tratamento do diabetes tipo 2, encontra-se a droga oral acarbose, um oligossacarídeo complexo de origem microbiana que, por competitividade inibe a atividade das enzimas α -glicosidases, impedindo a hidrólise de carboidratos complexos em glicose e frutose no intestino, bem como a atividade da enzima α -amilase pancreática, porém com menor efeito, retardando assim a absorção de monossacarídeos pelo organismo, resultando na diminuição da glicemia pós-prandial de maneira dose-dependente (Florez; Sanchez; Marks, 2009; Balfour; Mctavish, 1993; Clissold; Edwards, 1988). A partir da redução nos níveis de glicose sanguínea e consequente controle da hiperglicemia persistente, muitas das disfunções metabólicas sistêmicas, como o estresse oxidativo, podem ser atenuados, incluindo as complicações neurológicas e comportamentais/cognitivos causadas pela morte neuronal e/ou deformação estrutural do tecido nervoso, alterações na transmissão sináptica, déficit cognitivo, funções de memória, depressão, hipolocomoção, entre outros (Patel; Udayabanu, 2017).

O perfil fitoquímico completo da *Pouteria ramiflora* foi revelado por Oliveira e colaboradores (2014). As diversas atividades biológicas possíveis para *Pouteria ramiflora* podem estar relacionadas às diferentes classes de metabólitos secundários encontrados, como compostos fenólicos, taninos, antraquinonas livres, cumarinas, esteroides, triterpenos, saponinas, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides (Oliveira et al., 2014). Ainda, flavonoides

foram identificados no extrato desta planta (Correia et al., 2016), bem como miricetina glicosilados e ácido gálico (Costa, 2014).

O efeito do tratamento com acarbose e com extrato de *Pouteria ramiflora* parece ser positivo pela perspectiva antioxidante. Assim, o estudo da morfometria, não determina, mas indica que pode ter ocorrido diminuição do estresse oxidativo ou dos níveis glicêmicos com resposta direta no cérebro dos ratos avaliados. Estudo de Da Costa e colaboradores (2013) evidenciou por análises bioquímicas a resposta antioxidante e hipoglicemiante do extrato da folha da *Pouteria ramiflora*, bem como efeito positivo de neuroproteção nas células hipocâmpais. Neste mesmo estudo, os autores também observaram que o tratamento com o extrato desta planta restaurou os níveis de um motor molecular importante no transporte de vesículas sinápticas, evidenciando assim o efeito neuroprotetor da *Pouteria ramiflora* no diabetes mellitus.

CONCLUSÃO

É possível sugerir, com os dados obtidos, que o extrato hidroalcoólico da casca do caule de *Pouteria ramiflora* possui efeito neuroprotetor nas células do hipocampo, uma vez que em comparação com o tratamento com acarbose, houve aumento na quantidade de células presentes nas subregiões do hipocampo, indicando diminuição de perda neuronal, além do aumento no diâmetro nuclear, demonstrando efeito contra o estresse oxidativo. Estudos futuros são necessários para a compreensão do mecanismo de ação da *Pouteria ramiflora* tanto na biologia molecular das células hipocâmpais quanto no tratamento do diabetes mellitus.

REFERÊNCIAS

ARTOLA, A. Diabetes-, stress- and ageing-related changes in synaptic plasticity in hippocampus and neocortex—the same metaplastic process?. **European Journal of Pharmacology** v. 585, n. 1, p. 153-162, 2008.

BALFOUR, J.A; MCTAVISH, D. Acarbose. **Drugs** v. 46, n. 6, p. 1025-1054, 1993.

BIESSELS, G.J. et al. Cerebral function in diabetes mellitus. **Diabetologia** v. 37, n. 7, p. 643-650, 1994.

CALÁBRIA, L.K. et al. Myosins are differentially expressed under oxidative stress in chronic streptozotocin-induced diabetic rat brains. **ISRN Neuroscience** v. 2013:423931, p. 1-10, 2013.

CHENG, A.Y. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal** v. 172, n. 2, p. 213-226, 2005.

CLISSOLD, S.P.; EDWARDS, C. Acarbose. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. **Drugs** v. 35, n. 3, p. 214-243, 1988.

CORREIA, A.F. et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. **BMC Complementary and Alternative Medicine** v. 16, n. 203, p. 1-9, 2016.

COSTA, D.L.M.G. **Estudo químico e avaliação da atividade mutagênica dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Pouteria torta* e *Pouteria ramiflora* (Sapotaceae).** Araraquara. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2014. 144 f.

DA COSTA, A.V. et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease** v. 28, n. 3, p. 411-419, 2013.

DA SILVA, A.V. **O Hipocampo normal e patológico.** 2007. Disponível em: <http://epilepsia.org.br/lasse/mat_didatico/lasse1/textos/alexandre01.html>: Acesso em: 28 jun. 2018.

DE GOUVEIA, N.M. et al. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013.

DI MARIO, U. et al. Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus. **Diabetes Metabolism Reviews** v. 11, n. 3, p. 259-277, 1995.

FLOREZ, H.J.; SANCHEZ, A.A.; MARKS, J.B. **Type 2 Diabetes**. In: BIESSELS G., LUCHSINGER J. (eds) *Diabetes and the Brain. Contemporary Diabetes*. New York: Humana Press, 2009. p. 33-53.

GONZÁLEZ, A.J.C. **Avaliação da atividade neuroprotetora do ácido clorogênico no hipocampo de ratos wistar, submetidos a status epilepticus por lítio-pilocarpina**. Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Universidade de São Paulo, 2016. 60 p.

HELKALA, E.L. et al. Short-term and long-term memory in elderly patients with NIDDM. **Diabetes Care** v. 18, n. 5, p. 681-685, 1995.

IBRAHIM, D.S. Neuroprotective effect of Cucumis melo Var. flexuosus leaf extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Metabolic Brain Disease** v. 32, n. 1, p. 69-75, 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org>> Acesso em 01 jun. 2018.

LOPES, A.C.P. et al. Aspectos moleculares da transmissão sináptica. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)** v. 32, n. 2, p. 167-188, 1999.

MCCALL, A.L. The impact of diabetes on the CNS. **Diabetes** v. 41, n.5, p. 557-570, 1992.

MOORADIAN, A.D. Diabetic complications of the central nervous system. **Endocrine Reviews** v. 9, n. 3, p. 346-356, 1988.

MOREIRA, R.D. et al. Dimensão fractal na quantificação do grau de rejeição celular miocárdica pós-transplante cardíaco. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular** v. 26, n. 2, p. 155-163, 2011.

MOURA, V.L. **Fracionamento e caracterização parcial de constituintes químicos do extrato bruto de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) biomonitorados pela inibição in vitro da atividade da alfa-Amilase Salivar Humana (HSA)**. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, 2008. 55 f.

NAIK, S.R. et al. Protective activity profile of herbomineral medicine in early diabetic nephropathy rats: Restoration of kidney antioxidants, hemodynamics and suppression of proinflammatory mediators. **Biomedicine & Aging Pathology** v. 4, n. 1, p. 33-41, 2014.

OLIVEIRA, A.K.M. et al. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira** v. 32, n. 1, p. 41-47, 2014.

PARK, C.R. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. **Neuroscience Biobehavior Reviews** v. 25, n. 4, p. 311-323, 2001.

PATEL, S.S.; UDAYABANU, M. Effect of natural products on diabetes associated neurological disorders. **Reviews in the Neurosciences** v. 28, n. 3, p. 271-293, 2017.

ROSA, M.M; DIAS, T. Commonly used endocrine drugs. **Handbook of Clinical Neurology** v. 120, n. 54, p. 809-824, 2014.

SALES, P.M. et al. A-Amylase Inhibitors: A review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences** v. 15, n. 1, p. 141-183, 2012.

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018**. São Paulo: Clannad; 2017.

SEABRA, A.L.R. et al. Lesão de isquemia e reperfusão após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva** v. 25, n. 2, p. 105-109, 2012.

SOUZA, P.M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma cerrado**. Brasília. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, 2011. 99 f.

SOUZA, P.M. et al. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica** v. 78, n. 4, p. 393-399, 2012.

TAVARES, A.L.A. **Padrões de descarga neuronal na região de CA1 do hipocampo de pacientes com epilepsia do lobo temporal e de ratos com epilepsia induzida pela pilocarpina: um estudo comparativo**. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. 205 f.

TOMLINSON D.R.; GARDINER N.J. Glucose neurotoxicity. **Nature Reviews. Neuroscience** v. 9, n. 1, p. 36-45, 2008.

WOLLMANN, L.C.F. et al. Effects of cryopreservation and/or decellularization on extracellular matrix of porcine valves. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery** v. 26, n. 3, p. 490-496, 2011.

ZHAO, W. et al. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. **The Journal of biological chemistry** v. 274, n. 49, p. 34893-34902, 1999.

ANEXO 1

Normas da Revista Horizonte Científico

1. FORMATAÇÃO DO TEXTO:

1.1. Margens de 2,5 cm, espaçamento 1,5 cm, fonte Times New Roman 12. espaçamento 1,5
Cada página deverá ser numerada consecutivamente com algarismos arábicos no canto superior direito;

1.2. O artigo deverá conter no máximo 30 páginas e deve estar em formato DOC. (versão 97-2003 do WORD) OBS: A formatação deve ser em uma coluna.

1.3. Os nomes dos autores devem constar somente na Submissão de Metadados, devendo ser excluídos do corpo do texto.

OBS: os nomes dos autores serão incluídos no processo de Editoração de Texto, logo após a avaliação dos pareceristas.

1.4. As ilustrações (mapas, fotos (colorido ou preto e branco), etc.) devem fazer parte do corpo do texto em formato digital GIF ou JPEG. Os gráficos também devem fazer parte do corpo do texto;

1.5. Notas de rodapé: serão aceitas quando forem absolutamente necessárias para explanações que não possam ser incluídas no texto ou nas tabelas, tais como: a) nome da instituição onde foi realizado o trabalho; b) consignação de bolsas e outros auxílios financeiros; c) comunicação pessoal. As notas de rodapé deverão ser anunciadas no texto mediante número sobrescrito e devem figurar na página em que o número aparece;

1.6. Os nomes científicos devem ser escritos, no texto, na íntegra (Ex.: *Vellozia caruncularis* e não *V. caruncularis*;

1.7. Quando o texto contiver fórmulas editadas no módulo de Equações do Word, o tamanho deve ser o seguinte: Interno – 12 pts; Subscrito/Subrescrito – 10pts; Sub-Subscrito/Sobrescrito – 8 pts; Símbolo – 12 pts e Sub-Símbolo – 10 pts;

1.8. O texto é de inteira responsabilidade dos autores. A redação deve ser clara, concisa e objetiva e a linguagem correta, precisa, coerente e simples. Adjetivos supérfluos devem ser evitados, assim como, a forma excessivamente compacta, que pode prejudicar a compreensão do texto. O texto deve passar por uma criteriosa correção de português antes de ser enviado para a publicação; A Revista Horizonte Científico se resguarda o direito a pequenas adequações textuais para melhor compreensão do texto.

1.9. Os autores concedem os direitos autorais para futuras publicações desde que a fonte seja referenciada.

2. FORMATO DO ARTIGO:

2.1. TÍTULO: em letra maiúscula e negrito. Deve ser conciso e informativo.

2.2. NOME DOS AUTORES: os nomes completos dos autores (em letra maiúscula) deverão estar posicionados entre o título em português e o Resumo, alinhados a esquerda, colocados em seqüência horizontal, identificados com número sobrescrito e caracterizado no rodapé da primeira página, conforme a seguinte seqüência: unidade acadêmica, instituição, endereço, cidade, CEP e endereço eletrônico do autor para correspondência.

O Resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

2.3. ABSTRACT, RÉSUMÉ ou RESUMEN: O artigo deverá ser encaminhado com o resumo em português e em uma segunda língua, que poderá ser o inglês, francês ou Espanhol. OBS: O resumo e o abstract devem constar em página exclusiva do texto. Exceção: nos casos em que o resumo e o abstract couberem na mesma página.

2.4. PALAVRAS CHAVE: até 5, em espanhol, inglês, francês e português. O abstract, résumé, resumen e o Resumo devem conter, no máximo, 250 palavras.

2.5. TEXTO: O texto deverá iniciar logo a seguir, colocando sequencialmente: INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS; RESULTADOS; DISCUSSÃO; CONCLUSÃO; AGRADECIMENTOS (se necessário) e REFERÊNCIAS.

OBS.: A critério dos autores os itens Resultados, Discussão e Conclusão, poderão aparecer em separado ou Resultados e Discussão juntos e ainda as Conclusões poderão aparecer junto com a Discussão. Citar cada figura e tabela no texto em ordem numérica crescente. Todas as citações, no decorrer do texto, devem ser incluídas na lista de Referências Bibliográficas, em ordem alfabética, de acordo com as normas ABNT (NBR-6023/89), conforme alguns exemplos abaixo: Livros completos: LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R.G.; SIQUEIRA JÚNIOR, W. Introdução a geografia médica no Brasil. São Paulo: Blucher, 1972. 568 p. (se houver número do volume, indicar também) Parte de Livro com autoria específica: FLEURY, J. A. Análise a nível de empresa dos impactos da automação sobre a organização da produção de trabalho. In: SOARES, R.M.S.M. Gestão da empresa. Brasília: IPEA/IPLAN, 1980. p. 149-159. Parte de Livros sem autoria específica: MARTIN, L.C.T. Confinamento de bovino de corte. São Paulo: Nobel, 1986. 124p. Cap.3: Nutrição de corte em confinamento, p.29-89. Folheto: PRATES, H.S.; PELEGRINETTI, J.R. Controle sanitário e cultural: legislação e relação de defensivos para citros. Campinas: Fundação Cargill, 1985. 40p. Artigos de revistas

e outros periódicos: MATOS, A. P. de. Epidemiologia da fusariose do abacaxi. Informe Agropecuário, Campinas, v. 11, n. 130, p 46-49, 1985. BAILEY, I.W. - The use and abuse of anatomical data in the study of phylogeny and classification. Phytomorphology v. 1, p. 67-69, 1951. Artigos apresentados em congresso – Impresso: SILVA, J.N.M. Possibilidades de produção sustentada de madeira em floresta densa de terra firme da Amazônia brasileira. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 6., 1990, Campos do Jordão. Anais... Campos do Jordão: SBS/SbEF, 1990. P..39-45. CD-ROOM: MUNIZ, C. A. de; QUEIRÓZ, S. A. de - Avaliação do desempenho até a desmama de bezerras cruzadas, no Mato Grosso do Sul. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora. Anais... Geratec, 1997. 1 CD-ROOM. Internet: SILVA, N.M. - The chemotaxonomy of plants. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura). SILVA, M.M.L. Crimes na era digital. Net, Rio de Janeiro, nov. 1998. Disponível: (colocar o endereço completo da página de onde foi retirada a informação): Acesso em: (data da captura). Dissertações e Teses: QUEIRÓZ FILHO, E.S.F.de. Análise da indústria de beneficiamento primário de madeira do Estado do Pará. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná, 1983. 103 p. Apostila: SILVA, C.E. Elaboração de trabalhos acadêmicos. Lavras: ESAL, 1990. 3p. Apostila. Publicações Institucionais (sem autores): FAO El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, 1981. 303p. Como fazer as citações no texto: Ex: Steel (1960) ou (Steel, 1960); Resende & Andrade (1992) ou (Resende & Andrade, 1992); Silva, Cardoso, Pereira (1990) ou (Silva, Cardoso,Pereira, 1960); Obras com mais de três autores poderá ser indicado apenas o primeiro autor, seguido da expressão "et al."; os dois primeiros autores seguido da expressão "et al." ou ainda os três primeiros autores seguidos da expressão "et al.", na ordem em que aparecem na publicação. Ex.: SOUZA, P.R. et al.; SILVA, J.P.; MELO, P.N. et al. ou FERREIRA, L.C.; SOUSA, T.R.; ANDRADE, M. et al. Citações Longas (mais de três linhas) devem constituir um parágrafo independente, recuado 4 cm da margem esquerda, com linhas separadas por espaço simples, letra menor que a do texto utilizado e sem aspas.