

AValiação MORFOMÉTRICA DOS HEPATÓCITOS DE RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM NEEM (*Azadirachta indica* A. JUSS) E ESTREPTOZOOTOCINA 6 CH

[*Morphometric evaluation of hepatocytes from diabetic rats treated with neem (Azadirachta indica A. Juss) and streptozotocin 6 CH*]

Matheus Henrique Magalhães Silva¹, Maria Rita Pacheco², Annita Moraes Girardi¹, Silvana Martinez Baraldi-Artoni², Edanir dos Santos², Fabiana Ribeiro Barreiro³

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP Campus de Jaboticabal, SP

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Campus de Jaboticabal, SP

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Campus de Jaboticabal, SP

RESUMO - Foram avaliados os efeitos de extratos de *Azadirachta indica* A. Juss e da estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados sobre a morfometria dos hepatócitos de ratos com diabetes mellitus induzida por estreptozotocina. Mediante os resultados morfométricos obtidos, conclui-se que alguns parâmetros analisados diferiram entre os grupos, porém não foi possível inferir nenhum efeito consistente dos tratamentos, no sentido de melhora ou piora das consequências do diabetes mellitus sobre o fígado, através apenas da morfometria dos hepatócitos. A análise morfométrica realizada revelou que o grupo controle branco apresentou os maiores valores médios para os parâmetros analisados no núcleo e no citoplasma, com exceção do fator de forma do núcleo. Porém, isto não implica que o diabetes mellitus tenha diminuído drasticamente estes valores, já que a literatura descreve medidas ainda menores para ratos de grupos controle, ou seja, não diabéticos.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, fígado, fitoterapia, homeopatia, morfometria.

ABSTRACT - The effects of extracts from *Azadirachta indica* A. Juss and streptozotocin, in extreme high dilutions in dinamized systems, on hepatocyte morphometry of rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin were evaluated. Some parameters presented significant differences among the experimental groups, but the effect of treatments to make better or worse the consequences of diabetes mellitus on liver was not detected using only the hepatocyte morphometry. The morphometric analysis evidenced that the white control group presented the highest mean values for nucleus and cytoplasm parameters, with the exception of the nuclear shape factor. However, this situation did not imply the diabetes mellitus was the cause of drastic reduction in these values, since the literature describes lower measurements for rats from the control group (non-diabetic rats).

Keywords: Diabetes mellitus, homeopathy, liver, morphometry, phytotherapy.

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 OMS, principalmente por razões econômicas e sociais (Martins et al., 1998).

A *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 exigente 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-CNPAP (Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão) em Goiânia - GO, com o intuito de

preparação de carrapaticida para bovinos. Atualmente, 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 estreptozotocina (Chattopadhyay, 1999; Alam et al., 1990). Khosla et al., (2000) confirmaram seu efeito hipoglicemiante em coelhos diabéticos aloxânicos tratados com extratos de folhas e óleo das sementes da *A. indica* e, comparando-a à glibenclamida, 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. Rosa et al. (2011) observaram, através de análise morfométrica das ilhotas de Langerhans de ratos diabéticos, que nem o tratamento homeopático com estreptozotocina, tampouco o uso de extratos aquoso e hidroalcoólico de *A. indica*, induziram a regeneração do pâncreas endócrino.

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., 2000). 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 do incluem hiperglicemia, aumento progressivo da glicosúria e do volume urinário, o peso corporal dos animais tende a diminuir e lipemia. Marles & Farnsworth (1995) sugeriram 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.

Parshad et al. (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 *A. 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. 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. Chattopadhyay (1999) relatou que o efeito hipoglicemiante do extrato das folhas de *A. indica* deve-se ao bloqueio do efeito inibitório da serotonina sobre a liberação de insulina mediada pela glicose.

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.

Quanto à sua morfologia, o fígado é considerado uma glândula grande e lobada. Cada lobo é coberto por um mesotélio, por baixo do qual há uma camada de tecido conjuntivo fina, a cápsula de Glisson. Cada lobo se divide em numerosos lóbulos clássicos. Estes consistem de sinusóides e placas de células parenquimatosas (hepatócitos), organizadas radialmente ao redor de uma veia central. A bile, secretada por hepatócitos, entra em pequeninos canalículos biliares, a partir dos quais flui para o interior dos canais de Hering e destes para o ductulo biliar de um trato portal, terminando no interior dos ductos biliares. O epitélio desses ductulos é cubóide simples, enquanto que o dos ductos é colunar simples. Nos ductos biliares maiores, ocorrem células caliciformes (Bacha Jr. & Bacha, 2003). Os hepatócitos são células poliédricas com seis ou mais superfícies e diâmetro de 20-30 μ m. Em cortes

corados com hematoxilina e eosina, o citoplasma do hepatócito é eosinofílico, principalmente devido ao grande número de mitocôndrias e algum retículo endoplasmático liso. Possui um ou dois núcleos arredondados contendo um ou dois nucléolos. Apresenta abundante retículo endoplasmático, tanto liso quanto rugoso. O retículo endoplasmático rugoso forma agregados que se dispersam no citoplasma, denominados corpos basofílicos. Geralmente o hepatócito não armazena as proteínas nos polirribossomos aderidos ao retículo endoplasmático rugoso em grânulos de secreção no citoplasma. O retículo endoplasmático liso, distribuído difusamente pelo citoplasma, é responsável pela inativação ou detoxificação de várias substâncias antes de sua excreção pelo organismo. A secreção de bile é uma função exócrina, já que os hepatócitos captam do sangue, transformam e excretam vários componentes para o interior dos canálculos biliares. O hepatócito contém glicogênio, que aparece ao microscópio eletrônico na forma de agregados elétron-densos no citossol, frequentemente associados ao retículo endoplasmático liso. Este glicogênio hepático é mobilizado quando a glicose sanguínea cai abaixo do nível adequado e, desta forma os hepatócitos contribuem para manter a glicemia estável. O hepatócito também é responsável pela conversão de aminoácidos em glicose, por meio de um processo enzimático complexo denominado gliconeogênese. Outro componente celular freqüente é a gotícula lipídica, cuja quantidade varia muito. O fígado também serve como um importante compartimento de armazenamento de lipídeos e algumas vitaminas, além de ser o principal sítio de desaminação de aminoácidos, processo que resulta na produção de uréia (Junqueira & Carneiro, 2008).

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 et al. (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 à óbito, hepatócitos com mitocôndrias hipertróficas, com aumento no número de cristas irregulares e anormais, bem como redução da eletrondensidade da matriz destas organelas.

Kumar et al. (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.

Quanto à morfometria dos hepatócitos de ratos, Drochmans et al. (1975) encontraram, para o citoplasma, valores médios de 19,00 a 20,50 μm para o diâmetro das células localizadas nas porções peri e centrolobular, respectivamente. Qian & Brosnan (1996) encontraram os seguintes valores para o grupo controle: área (246,20 μm^2); perímetro (60,78 μm); volume (2977,00 μm^3) e fator de forma (0,81). Martins et al. (2005) observaram os seguintes valores para o núcleo dos hepatócitos de fetos de ratos: diâmetro máximo (11,58 μm); diâmetro mínimo (8,59 μm); diâmetro médio (9,94 μm); diâmetro máximo / diâmetro mínimo (1,37); volume (543,92 μm^3); área (79,09 μm^2); perímetro (31,90 μm); volume / área (6,63 μm); fator de forma (0,96); índice de contorno (3,62); excentricidade (0,64); núcleo / citoplasma (0,314); volume citoplasmático (1645,76 μm^3) e volume celular (2189,67 μm^3). Já Silva et al. (2006) descreveram estas medidas para seus ratos do grupo controle: diâmetro máximo (7,25 μm); diâmetro mínimo (5,90 μm); diâmetro médio (6,52 μm); diâmetro máximo / diâmetro mínimo (1,24); perímetro (20,72 μm); área (34,14 μm^2); volume (154,88 μm^3); volume / área (4,35 μm); fator de forma (0,98); índice de contorno (3,58) e excentricidade (0,53).

Visto que o controle rigoroso da glicemia constitui até agora a única esperança de evitar as complicações fatais do diabetes mellitus (Cotran et al., 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, através de análise morfométrica 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

Foram preparados dois extratos de *Azadirachta indica*, A. Juss, um aquoso e outro etanólico, com as folhas do Neem cultivadas e fornecidas pela EMBRAPA-CNPAP, que previamente passaram por um processo de estabilização à sombra em um ambiente coberto e ventilado. Após esta secagem e trituração das folhas, foi preparado um extrato etanólico a 70% (p/p) por percolação, até o esgotamento do ativo, numa velocidade de 8 gotas por minuto e em seguida este foi concentrado até a obtenção de um extrato mole. O extrato aquoso foi obtido utilizando-se água destilada para realizar a percolação até o esgotamento do ativo, nas mesmas condições anteriores. Posteriormente, este extrato foi liofilizado.

Para o experimento, foram utilizados 25 ratos albinos machos da raça 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, através da artéria infraorbitária, amostras de sangue (1 mL) 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.

Todos os animais foram tratados diariamente (0,2mL/100g de peso vivo), através de gavage, da

seguinte forma: os grupos controle branco e controle branco diabético receberam água; um grupo recebeu extrato aquoso de *A. indica* a 10%; outro grupo foi tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *A. indica* a 10% e o último grupo com estreptozotocina em ultra alta diluições em sistemas dinamizados (estreptozotocina 6 CH). Este procedimento foi realizado durante 30 dias.

No 31º dia, os animais foram sacrificados e o fígados coletados foram fixados em solução de Bouin por 24 horas e processados, rotineiramente, para a inclusão em parafina. Após a microtomia semi-seriada, 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.

As análises morfométricas foram realizadas no núcleo e no citoplasma dos hepatócitos, medindo-se a área (µm²), perímetro (µm), diâmetro máximo (µm), diâmetro mínimo (µm) e fator de forma.

O fator de forma, cuja fórmula é expressa matematicamente por $\frac{(\text{perímetro})^2}{(4 \cdot \pi \cdot \text{área})}$, foi

programado, como os demais parâmetros, na memória do programa Image Pro-plus. O menor valor deste fator é igual a um, significando que a forma do citoplasma e/ou do núcleo se assemelha à forma de um círculo. Este fator é calculado, indiretamente, a partir da área do círculo, que tem por equação $\pi \cdot R^2$, como também a partir do perímetro do círculo, com a equação $2 \cdot \pi \cdot R$. Pela substituição da área e do perímetro obtêm-se:

Fator de forma:

$$\frac{(2 \cdot \pi \cdot R)^2}{4 \cdot \pi \cdot (\pi \cdot R^2)} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \cdot \pi \cdot \pi \cdot R^2)} = \frac{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)}{(4 \cdot \pi^2 \cdot R^2)} = 1$$

Quando este fator for maior que a unidade, entende-se que a forma do citoplasma e/ou do núcleo não é circular.

O experimento foi realizado conforme o delineamento inteiramente casualizado, com 5 tratamentos e 5 repetições. As médias foram comparadas mediante o teste de Tukey a 5% de probabilidade de acordo com Pimentel Gomes (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância dos resultados indicados na Tabela 1, referentes aos parâmetros mensurados no citoplasma dos hepatócitos, revelou para o teste F que houve diferenças significativas entre os tratamentos. Estas diferenças foram ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$) para a área (μm^2), diâmetro máximo (μm) e diâmetro mínimo (μm); e ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) para o perímetro (μm). Entretanto, o fator de forma não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

O teste de Tukey também mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios mensurados no citoplasma de hepatócitos, para a maioria dos parâmetros, entre os grupos experimentais, destacando-se que o grupo controle branco apresentou os maiores valores médios em todos os quesitos. Em relação à área e ao diâmetro mínimo, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle branco e os demais grupos experimentais, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). O perímetro apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) apenas na comparação entre os grupos controle branco e branco diabético. Para o

diâmetro máximo, foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle branco e os grupos tratados. Quanto ao fator de forma, os resultados encontrados não demonstraram diferenças ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais.

Em relação aos valores médios encontrados no citoplasma dos hepatócitos, neste estudo, verificou-se que o diâmetro no grupo controle branco variou de 19,13 μm (diâmetro mínimo) a 26,60 μm (diâmetro máximo). Assim, verificou-se que somente o diâmetro mínimo, deste grupo experimental, foi semelhante aos achados de Drochmans et al. (1975), quando encontraram valores médios de 19,00 μm a 20,50 μm para os diâmetros dos hepatócitos localizados nas porções peri- e centrolobular, respectivamente.

A morfometria comprovou que o grupo controle branco apresentou os maiores valores médios para todos os parâmetros analisados, comparado aos demais grupos experimentais. Entretanto, isto não prova que o diabetes mellitus diminuiu drasticamente os valores médios destes, pois Quian & Brosnan (1996), ao realizarem a morfometria de hepatócitos em ratos do grupo controle relataram medidas menores que as encontradas neste estudo.

Tabela 1- Valores de F, coeficiente de variação (CV), médias e diferença mínima significativa (DMS) a 5% obtidos nas análises de variância para os parâmetros medidos no citoplasma de hepatócitos do fígado de ratos machos albinos Wistar, dos grupos controles e tratados.

Tratamento	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Diâmetro Máximo (μm)	Diâmetro Mínimo (μm)	Fator de Forma
Controle Branco	421,71 a	82,88 a	26,60 a	19,13 a	1,30 a
Controle Branco Diabético	362,08 b	70,96 b	25,05 ab	16,72 b	1,13 a
Extrato Aquoso de <i>Azadirachta indica</i>	337,72 b	72,92 ab	23,99 b	16,73 b	1,25 a
Extrato Hidroalcoólico de <i>Azadirachta indica</i>	319,64 b	71,09 ab	23,26 b	15,96 b	1,26 a
Estrepto-zootocina 6CH	342,73 b	74,19 ab	24,27 b	17,24 b	1,28 a
Teste F	10,57**	3,31*	8,38**	8,95**	0,86 NS
CV	6,78	7,27	3,57	4,66	11,56
DMS (5%)	52,82	11,81	1,92	1,74	0,31

NS: não significativo

*: significativo a 5% de probabilidade

**: significativo a 1% de probabilidade

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A análise de variância dos resultados indicados na Tabela 2, referentes aos parâmetros mensurados no núcleo de hepatócitos, revelou para o teste F que houve diferenças significativas entre os tratamentos. Estas diferenças foram ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$) apenas para o perímetro (μm), ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0,05$) para a área (μm^2), diâmetro mínimo (μm) e fator de forma. Entretanto, o diâmetro máximo (μm) não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre os tratamentos.

O teste de Tukey também mostrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os valores médios, para a maioria dos parâmetros, entre os grupos experimentais, destacando-se que o grupo controle branco evidenciou os maiores valores médios para a maioria dos parâmetros medidos no núcleo de hepatócitos, excetuando-se o fator de forma cujo maior valor médio foi encontrado no grupo controle branco diabético. Em relação à área e diâmetro mínimo, observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$), entre o grupo controle branco e o grupo tratado com extrato hidroalcoólico (70%) de *A. indica* a 10%, grupos estes que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) dos demais grupos experimentais. Com referência ao perímetro, a

comparação entre os grupos experimentais confirmou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o grupo controle branco e os grupos tratados. No que tange ao diâmetro máximo os resultados encontrados não demonstraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais. O fator de forma apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas no confronto entre o grupo controle branco diabético e o grupo tratado com extrato aquoso de *A. indica* a 10%, grupos estes que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) dos demais.

Com referência aos valores médios encontrados no núcleo dos hepatócitos, neste estudo, a cariométrica mostrou que o grupo controle branco apresentou os maiores valores médios para a maioria dos parâmetros analisados, comparado aos demais grupos experimentais, excetuando-se o fator de forma, cujo maior valor médio foi encontrado no grupo controle branco diabético. Neste sentido, à nossa luz, isto não implica que o diabetes mellitus diminuiu drasticamente os valores médios dos parâmetros analisados, pois Silva et al. (2006) descreveram, para a cariométrica dos hepatócitos de ratos do grupo controle, valores médios menores do que os encontrados neste estudo.

Tabela 2- Valores de F, coeficiente de variação (CV), médias e diferença mínima significativa (DMS) a 5% obtidos nas análises de variância para os parâmetros medidos no núcleo de hepatócitos do fígado de ratos machos albinos Wistar, dos grupos controles e tratados.

Tratamento	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Diâmetro Máximo (μm)	Diâmetro Mínimo (μm)	Fator de Forma
Controle Branco	57,96 a	30,66 a	9,96 a	7,74 a	1,29 ab
Controle Branco Diabético	53,57 ab	29,73 ab	9,81 a	7,23 ab	1,32 a
Extrato Aquoso de <i>Azadirachta indica</i>	51,03 ab	27,99 b	9,48 a	7,10 ab	1,22 b
Extrato Hidroalcoólico de <i>Azadirachta indica</i>	48,96 b	27,58 b	9,32 a	6,75 b	1,24 ab
Estrepto-zotocina 6CH	49,95 ab	28,31 b	9,54 a	7,19 ab	1,28 ab
Teste F	3,16*	5,92**	1,88 NS	3,29*	4,41*
CV	7,74	3,68	3,90	5,46	2,89
DMS (5%)	8,84	2,32	0,82	0,86	0,08

NS: não significativo

*: significativo a 5% de probabilidade

**: significativo a 1% de probabilidade

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O fator de forma do citoplasma e do núcleo, em todos os grupos experimentais, expressou valores médios próximos à unidade, indicando, assim, que sua forma se assemelha à de um círculo.

CONCLUSÃO

Conclui-se, mediante os resultados morfométricos obtidos, que alguns parâmetros analisados diferiram entre os grupos, porém não foi possível inferir nenhum efeito consistente dos tratamentos, no sentido de melhora ou piora das consequências do diabetes mellitus sobre o fígado, através apenas da morfometria dos hepatócitos. A análise morfométrica realizada revelou que o grupo controle branco apresentou os maiores valores médios para os parâmetros analisados no núcleo e no citoplasma, com exceção do fator de forma do núcleo, cujo maior valor médio foi encontrado no grupo controle branco diabético. Porém, isto não implica que o diabetes mellitus tenha diminuído drasticamente estes valores, já que a literatura descreve medidas ainda menores para ratos de grupos controle, ou seja, não diabéticos.

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. 1990. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. *Fitoterapia*, 61(3):240-242.

Bacha Jr. W.J. & Bacha L.M. 2003. Atlas colorido de histologia veterinária. 2ª ed. Editora Roca, São Paulo, 457p.

Bolkent S., Yanardag R., Tabakoglu-Oguz A. & Ozsoy-Saçan O. 2000. Effects of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla) extract on pancreatic β cells in streptozotocin-diabetic rats: a morphological and biochemical study. *J. Ethnopharmacol.* 73(1-2):251-259.

Chattopadhyay R.R. 1999. Comparative evaluation of some blood sugar lowering agents of plant origin. *J. Ethnopharmacol.* 67(3):367-372.

Chopra R.N. 1958. The Nim (*Melia azadirachta* L. Meliaceae), p.360-363. In: Chopra R.N. *Indigenous drugs of India*. 2nd ed. Editora Academia Publishers, Nova Delhi.

Corrêa M.S.N.P. 1988. Alterações induzidas pelo diabetes insulino-dependentes na glândula submandibular do rato. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 239p.

Cotran R.S., Kumar V. & Robbins S.L. 2000. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. 6ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1400p.

Di Stasi L.C. 1996. *Plantas Mediciniais: arte e ciência*. Um guia de estudo interdisciplinar. Editora Edunesp, São Paulo, 230p.

Dyce K.M., Sack W.O. & Wensing C.J.G. 2004. *Tratado de anatomia veterinária*. 3ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 813p.

Drochmans P., Wanson J.C. & Mosselmans R. 1975. Isolation and subfractionation on ficoll gradients of adult rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* 66:1-22.

Furlan M.M.D.P. 2001. A estrepto-zotocina como agente diabogênico. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar.* 5(2):197-201.

Grinblat L. & Stoppani A.O.M. 1989. Diabetes and calcium transportation in liver mitochondria. *Medicina*, 49(1):21-27.

Hussain H.E.M.A. 2002. Reversal of diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats using traditional Indian anti-diabetic plant, *Azadirachta indica*, A. Juss (L.). *Indian J. Clinical Biochem.* 17(2):115-123.

Junqueira L.C. & Carneiro J. 2008. *Histologia básica – texto e atlas*. 11ª ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 524p.

Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., Matsuoka T., Fujitani Y., Umayahara Y., Hanafusa T., Matsuzawa Y., Yamasaki Y. & Hori M. 1999. Beneficial effects of antioxidants in diabetes. Possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes.* 48(12):2398-2406.

Khosla P., Bhanwra S., Singh J., Seth S. & Srivastava R.K. 2000. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica*, A. Juss (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 44(1):69-74.

King E.J. & Garner R.J. 1947. Colorimetric determination of glucose. *J. Clin. Pathol.* 1(1):30-33.

Koch C.K. 1990. El arbor de la India (*Azadirachta indica*) y su utilización potencial en el Ecuador con especial referencia a las propiedades plaguicidas de sus extractos. *Convênio GTZ/MAG, Ecuador*, 15p.

Kumar V., Abbas A.K. & Fausto N. 2005. *Robins e Cotran: Patologia – Bases Patológicas das doenças*. 7ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 1592p.

Lenk S.E., Bhat D.; Blakeney W. & Dunn W.A.Jr. 1992. Effects of streptozotocin-induced diabetes on rough endoplasmic reticulum and lysosomes of rat liver. *Am. J. Physiol.* 263:856-862.

Marles R.J. & Farnsworth N.R. 1995. Antidiabetic plants and their active constituents. *Review. Phytomedicine.* 2(2):137-189.

Martins A.T., Azoubel R., Lopes R.A., Matteo M.A.S. & Arruda J.G.F. 2005. Effect of sodium cyclamate on the rat fetal liver: A karyometric and stereological study. *Int. J. Morphol.* 23(3):221-226.

Martins E.R., Castro D.M., Castellani D.C. & Dias J.E. 1998. *Plantas Mediciniais*. Editora Imprensa Universitária – UFV, Viçosa, 220p.

Parshad O., West E. & Gardner M. 1999. Effects of aqueous extract of Neem (*Azadirachta indica*, A. Juss) on streptozotocin induced diabetic rats. Eighth Annual Research Conference, Oct. 22, Kingston. p.1.

Pimentel Gomes F. 2000. *Curso de estatística experimental*. 14ª ed. Editora Pimentel Gomes, Piracicaba, 477p.

Qian D. & Brosnan J.T. 1996. Administration of *Escherichia coli* endotoxin to rat increases liver mass and hepatocyte volume *in vivo*. *Biochem. J.* 313:479-486.

Ragasa C.Y., Nacpil A.D., Natividad G.M., Tada M., Coll J.C. & Rideout J.A. 1997. Tetranortriterpenoids from *Azadirachta indica*, A. Juss. Phytochemistry, 46(3):555-558.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. & Moore, P. K. 2004. Farmacologia. 5ª ed. Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 904p.

Rosa M.F., Pacheco M.R., Girardi A.M., Silva M.H.M., Santos E. & Baraldi Artoni S.M. 2010. Determinação da ação hipoglicemiante da *Azadirachta indica*, A. Juss (Neem) aclimatada no Brasil. Rev. Cient. Elet. Med. Vet. 8 (15). Capturado em 16 jul. 2010. Online. Disponível na Internet <http://www.revista.inf.br/veterinaria/artigos/ANOIIIIE/D15ART07.pdf>.

Rosa M.F., Pacheco M.R., Girardi A.M., Silva M.H.M., Santos E. & Baraldi Artoni S.M. 2011. Avaliação morfométrica das ilhotas de Langerhans de ratos diabéticos tratados com extratos de *Azadirachta indica* (Neem) e estrepto-zootocina 6 CH. ARS Vet. 27(3):175-180.

Santos E. 1990. Action hypoglycémiant de l'alloxane 6CH sur les rats diabétiques alloxaniques. Homeopathie, 3:38-39.

Saxena R.C. 1993. Scope of Nim for developing countries. Proceedings of World Nim Conference Souvenir, Feb. 24-28, Bangalore, p.30-36.

Schmutterer H. 1990. Properties and Potential of natural pesticides from the Nim tree (*Azadirachta indica*). Annu. Rev. Entomol. 35:271-297.

Shen X., Zhang K. & Kaufman R.J. 2004. The unfolded protein response — a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. J. Chem. Neuroanatomy. 28:79-92.

Tolosa E.M.C., Freitas Neto A.G., Behmer O.A. & Rodrigues C.J. 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. Editora Manole, São Paulo, 331p.

Vanhorebeek I., De Vos R., Mesotten M., Wouters P.J., De Wolf-Peeters C. & Van Den Berghe G. 2005. Protection of hepatocyte mitochondrial ultrastructure and function by strict blood glucose control with insulin in critically ill patients. The Lancet. 365(9453):53-59.