

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

Efeito do extrato da casca de uva (ACH09) na hiperglicemia e no sistema de sinalização de insulina em camundongos diabéticos

Michelle Teixeira Teixeira

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

Efeito do extrato da casca de uva (ACH09) na hiperglicemia e no sistema de sinalização de insulina em camundongos diabéticos

Dissertação apresentada ao Centro Biomédico da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Mestre em Fisiologia e Fisiopatologia Clínica e Experimental

Rio de Janeiro

2008

Ficha Catalográfica

Teixeira, Michelle Teixeira

Efeito do extrato da casca de uva (ACH09) na hiperglicemia e no sistema de sinalização de insulina em camundongos diabéticos

Michelle Teixeira Teixeira – Rio de Janeiro, 2008. xvii; 62f

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

Orientador: Roberto Soares de Moura

Co-orientador: Aníbal Sanchez Moura

1. Diabetes Mellitus. 2. Extrato de Casca de Uva. 3. Hiperglicemia.

4. Resistência insulínica. 5. Teses.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E PSICOBIOLOGIA

**Efeito do extrato da casca de uva (ACH09) na hiperglicemia e no sistema de
sinalização de insulina em camundongos diabéticos**

Michelle Teixeira Teixeira

Orientador: Professor Dr. Roberto Soares de Moura

Co-orientador: Professor Dr. Aníbal Sanchez Moura

Aprovada em 26 de fevereiro de 2008 pela banca examinadora:

Professora Dr. Ângela Resende

Professora Dr. Eliete Bouskela

Professor Dr. Paulo Melo

Rio de Janeiro

2008

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.
(Leonardo da Vinci)*

Dedicatória

À minha família e ao meu noivo pelo amor, paciência e companheirismo.

Agradecimentos

Aos meus pais e minha irmã por me darem todo o apoio necessário nesta jornada, acreditarem no meu sucesso e principalmente me aturarem nos momentos mais estressantes.

Ao meu noivo Claudio Daniel pelo companheirismo de sempre, mesmo na minha ausência física e/ou mental, por dividir comigo e acreditar nos meus sonhos e pelo amor inigualável que me dá todos os dias.

Às minhas amigas Annie Moreira, Fernanda Osso e Giselle França por toda a ajuda e ombro amigo dado durante o curso.

A minha avó por ser a pessoa mais incrível que eu conheço, uma prova de que a sabedoria vem com o tempo. À ela toda a minha admiração.

À todos anteriormente citados, agradeço por muitas vezes acreditarem mais em mim do que eu mesma e me fazerem enxergar isso nas horas mais difíceis. Amo vocês!

Ao Prof. Dr. Roberto Soares de Moura pelo exemplo de vida e profissionalismo, pelo ensinamento e principalmente pela amizade em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura por prontamente confiar em mim e fazer com que o meu mestrado acontecesse. Obrigada.

À Prof. Tânia Tano pela atenção e revisão do trabalho.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento: Prof. Dr. Érica Garcia, Alessandra Cordeiro, Alessandra Thole, Paula Paraguassú e

Mariana Renovato e especialmente a Renata Pereira e ao Mário Pereira pelas companhias matinais.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia, especialmente à Prof. Dr. Ângela Rezende, Dayane Ognibne, Cristiane Aguiar, Andréa Emiliano, Ana Paula Rocha, Mariana Costa, Lúcia Alves e Marcelo Vieira por todo o apoio e as mais divertidas confraternizações. Um agradecimento especial à Lenize Carvalho pela ajuda no início da minha jornada.

Aos colegas de turma do mestrado pela amizade.

As secretárias do CLINEX, Maria Amélia Souza e Eliane Soares pela paciência em me atender as inúmeras vezes que as procurei. E ao secretário Érick Lima do departamento de farmacologia por me deixar telefonar tanto.

Ao Prof. Dr. Egberto Moura pela preocupação e dedicação ao curso de Pós-graduação CLINEX.

Aos meus amigos que me incentivaram sempre e compreenderam minhas ausências.

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para realização deste trabalho.

Sumário

	Página
Lista de figuras	xii
Lista de abreviaturas	xiv
Divulgação deste trabalho em Congressos nacionais e internacionais	xv
Resumo	xvi
Abstract	xvii
1. Introdução	1
1.1 Definição e prevalência do Diabetes	1
1.2 Secreção da insulina	2
1.3 Ação da insulina	5
1.4 Indução do Diabetes experimental	8
1.5 Ação de fármacos na secreção e ação da insulina	9
1.6 Vinho tinto e benefícios cardiovasculares	11
1.6.1 Mecanismos de ação cardioprotetora do vinho tinto	12
1.7 Relação entre consumo de vinho tinto e Diabetes Mellitus	15
1.8 Extrato de casca de Uva (ACH09)	17
1.8.1 Características gerais das uvas	18
1.8.2 Características gerais dos polifenóis	19
2. Objetivo geral	22
2.1 Objetivos específicos	22
3. Metodologia	23
3.1 - Preparação do extrato de casca de uva (ACH09)	23

3.2 Isolamento e perfusão das ilhotas pancreáticas <i>in vitro</i>	23
3.3 Modelo animal de Diabetes Mellitus e protocolos experimentais	25
3.4 Análises de peso corporal	26
3.5 Análises Bioquímicas	26
3.5.1 Análise da glicose plasmática	26
3.5.2 Análise da Insulina plasmática	26
3.5.3 Análise da sensibilidade à insulina	28
3.5.4 Triglicerídios do plasma	28
3.5.5 Colesterol total do plasma	29
3.6 Biologia Molecular – Western blotting do IR, IRS-1, PI3K, Akt, pAkt e GLUT-4 muscular	29
3.7 - Análise estatística	31
4. Resultados	32
4.1 Secreção de insulina <i>in vitro</i>	32
4.2 Peso corporal	33
4.3 Glicemia	34
4.4 Insulinemia	36
4.5 Análise da sensibilidade à insulina	37
4.6 Análise de lipídeos plasmáticos	38
4.6.1 Análise de Triglicerídeos	38
4.6.2 Colesterol plasmático	39
4.7 Biologia Molecular – Western blotting	40
4.7.1 Conteúdo de receptor de insulina (IR)	40

4.7.2 Conteúdo de Substrato do Receptor de Insulina (IRS-1)	41
4.7.3 Conteúdo de fosfoditilinositol-3-Kinase (PI3-K)	42
4.7.4 Conteúdo de AKT total	43
4.7.5 Conteúdo de pAKT	44
4.7.6 Conteúdo total de GLUT-4	45
5. Discussão	46
6. Conclusão	53
7. Referências bibliográficas	54

Lista de figuras

	Página	
Figura 1	Esquematização da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas	5
Figura 2	Mecanismo de sinalização de insulina em células musculares	8
Figura 3	Estrutura química de alguns polifenóis	19
Figura 4	Secreção de insulina <i>in vitro</i> de 40 ilhotas isoladas de camundongos durante 30 minutos, estimuladas ou não com ACH09	31
Figura 5	Box Wiskar dos coeficientes angulares da regressão linear do ganho de peso dos camundongos durante o experimento	32
Figura 6	Efeito do tratamento com ACH09 na glicemia de camundongos controle e diabéticos induzidos por aloxânio (indução começando no dia 0). Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. *P<0.0006, #P<0.001 vs respectivo controle	33
Figura 7	Representação em barras da glicemia de jejum no dia -7 e 19 *P<0,0006, #P<0,001	34
Figura 8	Insulinemia de jejum no 19º dia de estudo. *P< 0,05	35
Figura 9	Índice de HOMA considerando a glicemia e a insulinemia do 19º dia.	36

*P< 0,01

Figura 10	Triglicerídeos plasmáticos no 19º dia após a indução do Diabetes	37
Figura 11	Colesterol total plasmático no 19º dia após a indução do Diabetes. *P<0,05	38
Figura 12	Receptor de insulina (IR) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5). *P<0,05	39
Figura 13	Substrato de receptor de insulina (IRS-1) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia de estudo. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5)	40
Figura 14	Fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3-K) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5)	41
Figura 15	Akt de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5)	42
Figura 16	Akt fosforilada de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia de estudo. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5). *P< 0,05	43
Figura 17	Transportador de glicose (GLUT-4) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média± erro padrão da média (n=5). *P< 0,05	44

Lista de abreviaturas

ACH09 – Extrato de casca de uva *Vitis vinifera*

AGL – Ácidos graxos livres

Akt – Tirosina quinase A

DM – Diabetes Mellitus

DM2 – Diabetes Mellitus tipo 2

EDHF – Fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDRF – Fator Relaxante Derivado do Endotélio

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

GLUT-2 – Transportador de glicose do tipo 2

GLUT-4 – Transportador de glicose do tipo 4

HDL – Lipoproteína de alta densidade

HOMA – “Homeostasis model assessment”

IR – Receptor de insulina

IRS – Substrato de receptor de insulina

JAK2 – Janus quinase A do tipo 2

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

L-NAME – Nitro-L-arginina metil éster

NO – Óxido nítrico

pAkt – Tirosina quinase A fosforilada

PI3K – Fostidilinositol 3 quinase

PPAR - Receptores de ativação de proliferação perixomais

ROS – Espécies reativas de oxigênio

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Divulgação deste trabalho em Congressos nacionais e internacionais:

- Teixeira MT; Moreira ASB; França GC; Garcia-Souza EP; Moura AS; Soares de Moura R. Extrato da casca de uva reduz a glicemia e modula a resistência insulínica em camundongos controles e diabéticos induzidos por aloxânio. XVII Congresso Brasileiro de Nutrição Parenteral e Enteral e V Congresso Brasileiro de Nutrição Clínica – Florianópolis 2007

PRÊMIO: *Apresentado oralmente e premiado na Categoria de Sessão Temática – passagem e inscrição para o ASPEN - Fev / 2008 – Chicago – EUA*

- Teixeira MT; Moreira ASB; França GC; Garcia-Souza EP; Resende AC; Moura AS; Soares de Moura R. Effect of a Vinifera (*Vitis vinifera*) Grape Skin Extract (ACH09) on hyperglycemia and insulin signaling system in alloxan treated mice . 17° European Meeting of Hypertension – Jun/2007 – Milão – Itália – Publicado no Eur J Hypertension 2007;25:S72.
- Michelle Teixeira¹; Annie Moreira²; Aníbal Moura²; Roberto Soares de Moura¹. Efeitos do extrato da casca de uva (GSE) na hiperglicemia em camundongos tratados ou com aloxânio, na resistência insulínica e sobre a expressão do Glut-4. XXII Congreso Latinoamericano - 1^o Iberoamericano de Ciencias Fisiológicas – Nov/2006 - Buenos Aires
- Soares de Moura R; Teixeira MT; França GC; Carvalho LC dos RM de; Tano T; Resende AC; Moura AS; Rocha APM. Efeito do Extrato Hidroalcoólico Obtido de Casca de Uva Vinífera (GSE) no Diabetes Aloxânico e na Secreção de Insulina. - 38° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental – Out/2006 - São Paulo

Resumo

O consumo moderado de vinho tinto tem sido associado com propriedades cardioprotetoras e recentemente com redução no risco de desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2. Esse estudo teve como objetivo investigar o efeito do Extrato da Casca de Uva *Vitis vinifera* (ACH09) na hiperglicemia e no sistema de sinalização de insulina de camundongos diabéticos induzidos por aloxânio. A glicemia, a insulina sérica, os triglicerídeos plasmáticos, o colesterol total e o Western Blotting de algumas proteínas da cascata de insulina foram avaliados em 4 grupos de camundongos adultos: grupo controle; grupo ACH09 (200 mg/kg/dia oral); grupo aloxânio (600 mg/kg i.p.) e grupo aloxânio+ACH09. A secreção de insulina de ilhotas pancreáticas *in vitro* também foi estudada. As glicemias dos grupos aloxânio+ACH09 e ACH09 foram menores do que as dos grupos aloxânio e controle, respectivamente. A insulina sérica foi significativamente menor no grupo aloxânio comparada aos animais controle. Observamos um aumento na resistência à insulina (índice de HOMA) nos animais tratados com aloxânio, mas não no grupo aloxânio+ACH09, além disso, houve aumento na sensibilidade à insulina no grupo ACH09. Não houve diferença nos níveis de triglicerídeos, no entanto, observou-se uma redução no colesterol total no grupo aloxânio+ACH09. O conteúdo total do receptor de insulina e da Akt fosforilada foi significativamente maior no grupo aloxânio+ACH09 comparado ao grupo aloxânio, entretanto não houve diferença nos conteúdos de IRS-1, PI3K e Akt entre os grupos estudados. O grupo aloxânio mostrou uma significativa redução no conteúdo total de GLUT-4 comparado ao grupo controle. Entretanto, houve um aumento significativo no conteúdo de GLUT-4 dos grupos aloxânio+ACH09 e ACH09. Não houve diferença na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas estimulada pela glicose+ACH09. Concluímos que o ACH09 tem efeito hipoglicemiante e anti-hiperglicemiante, que é independente do aumento na liberação de insulina, mas provavelmente, depende do aumento na sensibilidade periférica à insulina, devido à ativação da cascata de sinalização da insulina no músculo esquelético.

Palavras chaves: extrato de casca de uva, hiperglicemia, resistência à insulina, camundongo diabético, cascata da insulina.

Abstract

Moderate wine consumption has been associated with cardioprotective properties and recently with reduced risk of developing Type 2 diabetes. This study examines the effect of a *Vitis vinifera* grape skin extract (ACH09) on hyperglycemia and insulin signaling cascade in alloxan-treated mice. Glycemia, serum insulin and Western blot analysis of some protein of insulin cascade in gastrocnemius muscle were evaluated in 4 groups of adult mice: control; ACH09 200mg/kg/day orally; alloxan 600 mg/kg ip and alloxan plus ACH09. Insulin secretion in isolated pancreatic islets was also studied. Glycemias of alloxan plus ACH09 and ACH09 groups were significantly smaller than in alloxan treated and control group respectively. Serum insulin was significantly decreased in alloxan group compared to control mice. Increase in insulin resistance (HOMA Index) was observed in alloxan treated group but not in alloxan plus ACH09. Increase in insulin sensitivity was observed in ACH09 group. There was no difference in triglycerides levels, but a reduction in total cholesterol was observed in the group alloxan+ACH09. Insulin receptor content and Akt phosphorylation were significantly higher in alloxan plus ACH09 compared to alloxan treated group; however there were no changes in IRS-1, PI3-K and Akt among any group studied. Alloxan-treated mice showed a significant reduction in GLUT-4 content compared to control mice. A significant increase in GLUT-4 content was observed in alloxan plus ACH09 and ACH09-treated mice. Insulin secretion induced by glucose in isolated pancreatic islets was not changed by ACH09. The present results demonstrated that ACH09 has hypoglycemic and anti-hyperglycemic effects that are independent of an increase in insulin release, but is probably dependent on an increase in insulin sensitivity due to an activation of insulin signaling cascade in skeletal muscle.

Key words: grape skin extract, hyperglycemia, insulin resistance, diabetic mice, insulin cascade

1. Introdução

1.1 Definição e prevalência do Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica crônica, caracterizada por uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou na ação da insulina, associada à uma hiperglicemia crônica e distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (El-Alfy e col., 2005).

O DM tem sido considerado um problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento, devido ao aumento de sua prevalência e da morbi-mortalidade em função das suas complicações macro e microvasculares (Gomes, 2006). O principal determinante das complicações microvasculares é a hiperglicemia que acarreta anormalidades bioquímicas e estruturais de olhos, rins, coração, vasos sanguíneos e nervos periféricos. A duração e a magnitude da hiperglicemia estão ambas fortemente correlacionadas com a extensão e velocidade de progressão da doença microvascular (Aguiar e col., 2007).

A prevalência mundial de DM para todos os grupos de idade está projetada para aumentar de 171 milhões no ano 2000 para 366 milhões em 2030 (Amos e col., 1997). Esses números representam uma elevação na estimativa de prevalência de 2,8% para 4,4%, sendo que, a mudança geográfica mais importante acontecerá na população acima de 65 anos de idade. Além disso, o número de indivíduos com pré-diabetes, definido como intolerância à glicose de jejum e intolerância à glicose pós prandial, será de aproximadamente 500 milhões em 2030 (Wild e col., 2004).

Infelizmente, os relatos de prevalência de DM na população adulta brasileira não são atuais, de modo que, dados representativos da população residente em 9 capitais, datam do final da década de 80. Nesta época, estimou-se que, em média, 7,6% dos brasileiros entre 30 e 69 anos de idade apresentavam DM, e que incidia igualmente nos dois sexos e em brancos e não brancos, mas que aumentava com a idade e a adiposidade corporal. As maiores taxas foram observadas em cidades como São Paulo e Porto Alegre, sugerindo o papel da urbanização e da industrialização na patogênese desta doença (Malerbi & Franco, 1992). O estudo realizado em seguida, no Rio de Janeiro, demonstrou prevalência similar de DM (7,1%), entretanto as taxas foram maiores em mulheres do que em homens (Oliveira e col., 1996). Dados mais recentes, obtidos na cidade de Ribeirão Preto - São Paulo entre 1996 e 1997, indicaram que a prevalência brasileira pode ter aumentado em cinco pontos percentuais (Torquato e col., 2003).

As crescentes incidência e prevalência do DM são atribuídas ao crescimento e envelhecimento da população, urbanização e ao aumento na prevalência de inatividade física e hábitos alimentares que predisõem ao acúmulo de gordura corporal (Wild e col., 2004).

1.2 Secreção da insulina

A insulina é um hormônio anabólico, descoberto em 1922 por Banting e Best, com peso molecular de 5700, formada por 2 cadeias de aminoácidos conectadas por ligações dissulfeto (Aires, 1999).

O pâncreas é uma glândula mista com função exócrina, que se apresenta como um glândula acinosa envolvida na secreção de enzimas relacionadas a digestão alimentar, e com função endócrina, representada por agregados celulares denominados ilhotas de Langerhans distribuídas no parênquima pancreático compostas pelas células (Yamaoka & Itakura, 1999):

- Células alfa, produtoras de glucagon (15-20% do total)
- Células beta, produtoras de insulina (70-80%)
- Células delta, produtoras de somatostatina (5%)

A glicose é o principal estimulante da secreção de insulina na célula beta. Entretanto, além da glicose, outros nutrientes como leucina, a glutamina, a alanina, a arginina, a frutose, e alguns ácidos graxos, também podem induzir de forma independente ou de forma potencializadora (do efeito primário da glicose) a secreção de insulina (Gylfe, 1988). Ou seja, a síntese deste hormônio é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições (Zecchin e col., 2004).

A entrada de glicose na célula beta é garantida por um transportador de alta capacidade e baixa afinidade denominado GLUT-2 (subtipo específico encontrado em células beta). Após sua entrada, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato pela ação da enzima glicocinase, sendo a seguir direcionada à glicólise, etapa que consome 90% da glicose transportada ao interior da célula beta e responsável pela geração de piruvato. O piruvato é direcionado à mitocôndria, transformado em acetil CoA e metabolizado pelo ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico com conseqüente aumento na produção de ATP.

Com o aumento da relação ATP/ADP no meio intracelular, ocorre o fechamento de canais de K^+ - ATP dependentes, bloqueando o efluxo deste íon, responsável pelo equilíbrio elétrico da membrana, o que leva à despolarização da mesma. Esse mecanismo permite a abertura dos canais de Ca^{2+} - voltagem dependentes, possibilitando o influxo de Ca^{2+} para o meio intracelular da célula beta, o que desencadeia a fusão de vesículas secretoras contendo grânulos de insulina com a membrana plasmática e em seguida, a exocitose do hormônio insulina (Doyle & Egan, 2003), como pode ser observado na figura 1.

A perda de função da célula beta é um fator que aparece precocemente no desenvolvimento do Diabetes Mellitus do tipo 2 (DM2). Alguns medicamentos em uso clínico são capazes de modular a secreção de insulina. Fármacos, por exemplo, que inibem os canais de K^+ - ATP dependentes, como as sulfoniluréias, estimulam a secreção de insulina, mesmo em ausência de glicose, enquanto fármacos como o anti-hipertensivo diazóxido, que estimulam a abertura desses mesmos canais, reduzem a secreção de insulina (Tarasov e col., 2004).

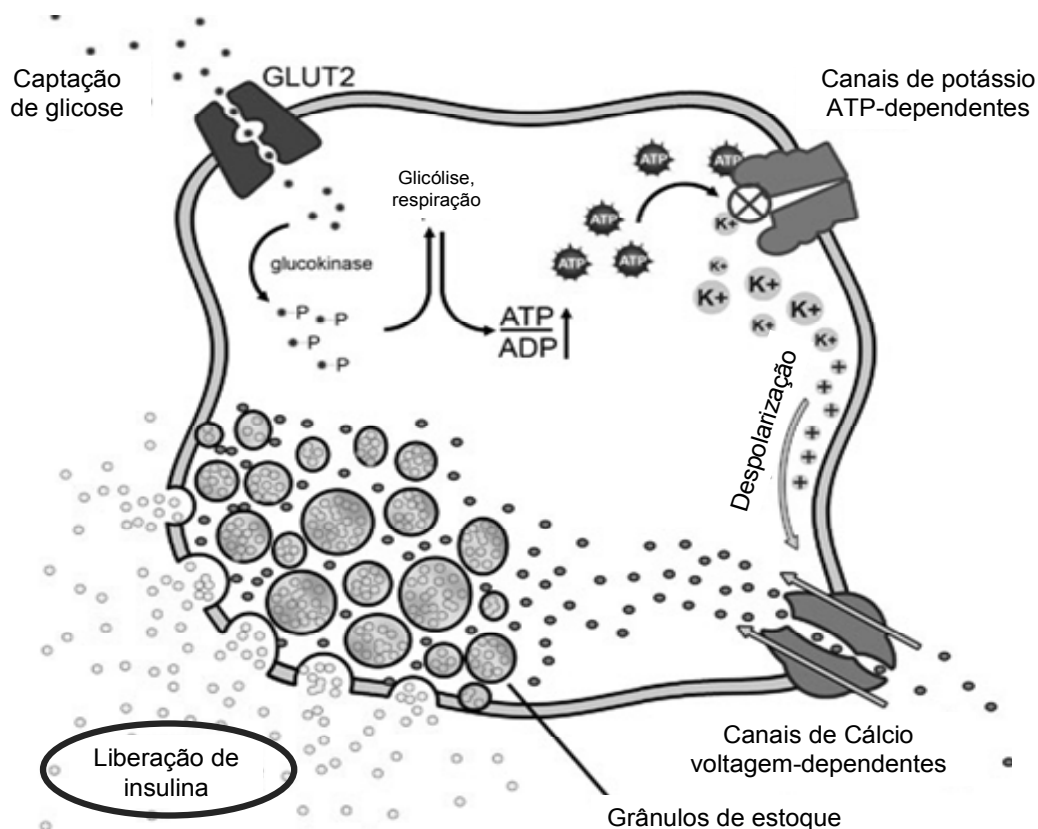


Figura 1 – Esquemática da secreção de insulina pelas células beta pancreáticas (Adaptado de <http://www.betacell.org>)

1.3 Ação da insulina

Após sua síntese, a insulina age em vários tecidos periféricos, tais como o fígado, o músculo, o coração e o tecido adiposo. A insulina é o mais potente agente anabólico conhecido e nestes locais promove aumento da captação de glicose sanguínea e da síntese protéica, além de diminuir a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, e reduzir a lipólise e a proteólise (Saltiel & Kahn, 2001).

O primeiro passo pelo qual a insulina aumenta o estoque energético envolve a regulação do transporte de glicose para dentro da célula, mediado pelo

transportador de glicose do tipo 4 (GLUT-4), dependente da ação de insulina, através de uma cascata de sinalização da mesma (Chang e col., 2004). Cerca de 75% da captação de glicose dependente da ação da insulina ocorre no músculo esquelético, enquanto o tecido adiposo é responsável apenas por uma pequena fração (Saltiel & Kahn, 2001).

A cascata de sinalização da insulina nos tecidos periféricos (figura 2) se inicia com a sua ligação ao seu receptor específico na membrana, composto de duas subunidades alfa e duas subunidades beta, que atua como uma enzima alostérica, ou seja, a ligação da insulina na subunidade alfa, permite que a subunidade beta adquira atividade quinase, levando a alteração conformacional e a autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina. O receptor da insulina (IR) além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em resíduos de serina, porém, isso diminui a transmissão do sinal para a cascata da sinalização da insulina, podendo provocar a resistência à insulina (Zecchin e col., 2004).

Uma vez ativado, o IR fosforila vários substratos protéicos em tirosina, como por exemplo a Cbl, um protooncogene também envolvido na via de transporte de glicose estimulada pela insulina, a JAK2, envolvida na via de sinalização da leptina, e os substratos de receptor de insulina (IRS). Existem 4 tipos de IRS, sendo que o IRS-1 e 2 parecem estar mais envolvidos no metabolismo glicídico. Animais “Knockout” para IRS-1 desenvolvem resistência à insulina sem hiperglicemia, pois o IRS-2 pode compensar parcialmente a ausência de IRS-1. E aquele sem o gene que codifica o IRS-2 apresenta anormalidades na secreção e ação da insulina com resultante hiperglicemia. Por outro lado, os IRS-3 e IRS-4 não participam do metabolismo da glicose nem da via de crescimento, visto

através de animais “Knockout” para essas proteínas, que tinham desenvolvimentos quase normais quanto à estes aspectos (Saltiel & Kahn, 2001).

A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia Src 2 (SH2), dentre elas a fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K). A PI3-K possui duas subunidades, uma catalítica (p110) e uma regulatória (p85). A ligação dos sítios fosforilados das proteínas IRS ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3-K ativa o domínio catalítico associado da subunidade p110. A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol gerando fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). O último é capaz de regular a PDK-1 (“phosphoinositide-dependent kinase 1”), que fosforila e ativa outra serina/treonina quinase conhecida como Akt ou PKB (Saltiel & Kahn, 2001).

A ativação da Akt vai levar a translocação de vesículas intracelulares contendo GLUT-4 para a superfície da membrana celular com conseqüente exocitose destes transportadores de glicose, que irão captar a glicose circulante. O mecanismo pelo qual este passo acontece permanece obscuro (Zecchin e col., 2004).

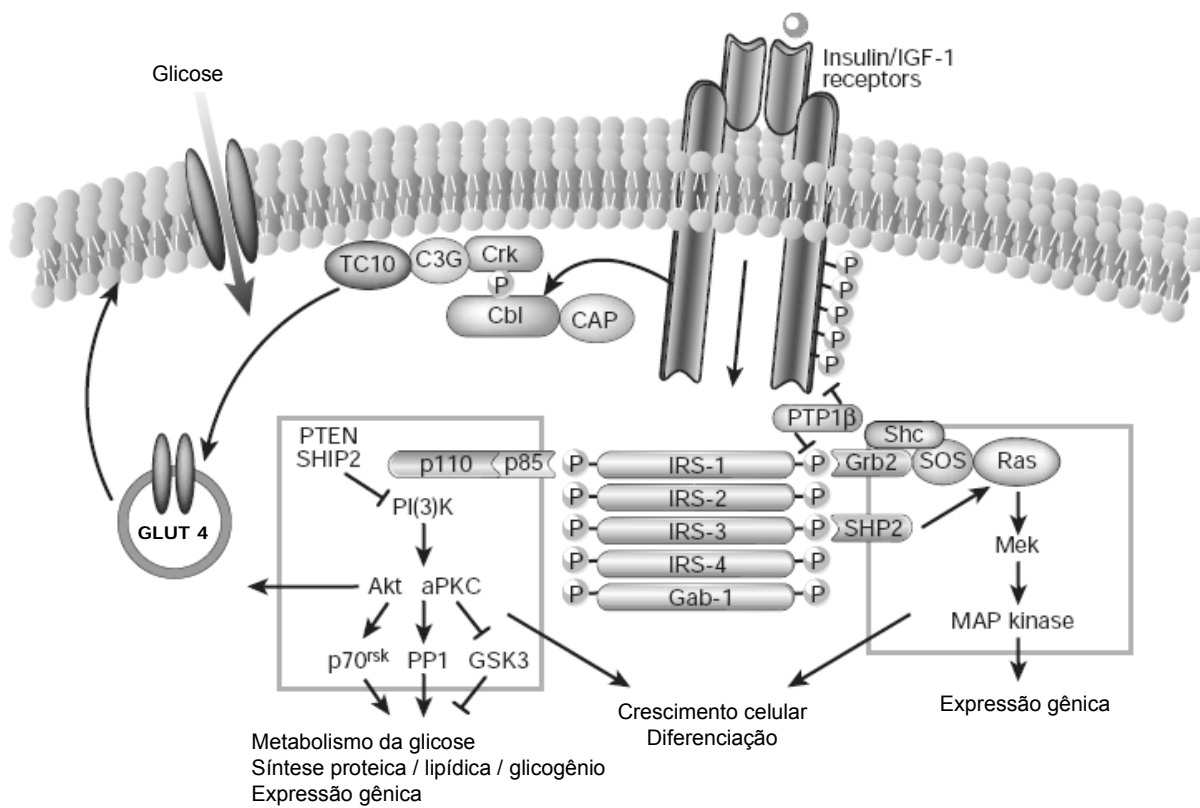


Figura 2 – Mecanismo de sinalização de insulina em células musculares
(Adaptado de Saltiel & Kahn, 2001)

1.4 Indução do Diabetes experimental

A indução de Diabetes experimental em camundongos usando drogas com capacidade de destruir seletivamente as células beta pancreáticas é muito conveniente e simples de ser feita. O aloxânio é uma das substâncias mais utilizadas, é um composto químico hidrofílico derivado de pirimidina, o 2,4,5,6 tetraoxopirimidina (im Walde e col., 2002).

Sua toxicidade nas células beta pancreáticas é o somatório de vários processos como inibição da enzima chave da glicólise, a glicoquinase, através da

oxidação de dois grupos tióis, e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela produção de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, sendo que as estruturas atingidas pelo dano oxidativo ainda não são muito bem determinadas, mas parece que o GLUT-2 é uma delas (El-Alfy e col., 2005; Szkudelski, 2001),

Adicionalmente, parece que o aloxânio também age nas células beta pancreáticas causando distúrbios na homeostase do cálcio e a oxidação de compostos celulares contendo radicais sulfidrilas (SH) (El-Alfy e col., 2005; Szkudelski, 2001), levando a redução da secreção de insulina no pâncreas e também diminuição da sensibilidade à insulina (Boylan e col., 1992).

1.5 Ação de fármacos na secreção e ação da insulina

Antidiabéticos orais são substâncias que têm a finalidade de reduzir e manter a glicemia normal. Eles podem ser separados em medicamentos que: reduzem a velocidade de absorção de glicídios (ex. inibidores da alfa-glicosidase), diminuem a produção hepática de glicose (ex. biguanidas), aumentam a sua utilização periférica (ex. glitazonas ou tiazolodinedionas) e incrementam a secreção pancreática de insulina (ex. sulfoniluréias e glinidas) (Moller, 2001).

Sulfoniluréias, como a clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida, e a glimeperida, são drogas com ação hipoglicemiante que atuam no pâncreas aumentando a secreção de insulina. Elas se ligam aos seus receptores na superfície das células beta pancreáticas denominados SUR, que são intimamente ligados com subunidades dos canais de K^+ sensíveis ao ATP induzindo ao fechamento desses canais, com conseqüente inibição da saída dos íons potássio, desencadeando o processo de despolarização e secreção de insulina. Entretanto,

esses fármacos não afetam a sensibilidade à insulina e causam efeitos indesejáveis, os principais são a hipoglicemia e o ganho de peso, e a longo prazo, prejuízos renais ou hepático (Cheng & Fantus, 2005).

As tiazolodinedionas, como a rosiglitazona e a pioglitazona, são fármacos sensibilizadores da ação da insulina. Apresentam como característica de sua estrutura química, um anel diona que confere atividade anti-hiperglicêmica que, entretanto, depende da insulina. Seu mecanismo de ação depende da ligação aos receptores nucleares PPARs (receptores ativadores de peroxissomo proliferativo) do tipo γ expressos principalmente no tecidos adiposo e muscular (Moller, 2001), mas também nas células beta pancreáticas, endotélio e macrófago. Uma vez ligados, esse fármacos aumentam a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídeos. Além disso, as glitazonas melhoram a sensibilidade à insulina por reduzirem os níveis de ácidos graxos circulantes (AGL) que resultariam em lipotoxicidade; por reduzirem a liberação de TNF- α , que levaria ao aumento de lipólise, aumentando o AGL; por induzirem a fosforilação em serina ao invés de treonina na cascata de sinalização de insulina e por aumentarem a produção de adiponectina (Gomes, 2006). Ainda, estudos em modelos animais têm demonstrado que as tiazolodinedionas melhoram e preservam a função das células beta pancreáticas (Cheng & Fantus, 2005). Por outro lado, seu uso provoca efeitos adversos tais como ganho de peso, edema, hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (Cheng & Fantus, 2005; Gomes, 2006).

Atualmente, o tratamento do DM se baseia principalmente na redução da hiperglicemia pelo uso destes medicamentos. Contudo, devido ao fato dos efeitos

adversos e eficácias desses componentes ainda serem discutíveis, existe uma alta demanda por novos compostos para o tratamento do DM (Vijayakumar e col., 2005). A partir disto, os produtos naturais têm sido sugeridos como uma rica e inexplorada fonte de possíveis drogas hipoglicemiantes.

1.6 Vinho tinto e benefícios cardiovasculares

Desde 1979, o consumo de vinho tinto tem sido relacionado com menor número de mortes por isquemia cardíaca (St Leger e col., 1979). Esta idéia foi ampliada em 1992, quando Serge Renaud observou que a maioria dos países que consumiam uma quantidade elevada de gordura saturada estavam positivamente relacionados com alta mortalidade por doença cardíaca coronária, mas que, entretanto, esta associação não era observada na França, que possuía alto consumo de gordura saturada, porém com baixa mortalidade por doença cardíaca. Esta relação ficou conhecida como “Paradoxo Francês” e foi atribuída ao consumo elevado de álcool, principalmente vinho, e à dieta mediterrânea (Renaud & Lorgeril; 1992). Desde então, diversos autores vêm demonstrando que o consumo prolongado de vinho tinto em doses moderadas é benéfico para saúde.

O mecanismo pelo qual o vinho tinto exerce seu efeito cardioprotetor ainda não foi completamente estabelecido, mas acredita-se que as ações salutares provavelmente sejam devido à inibição da agregação plaquetária (Demrow e col., 1995; Hertog e col., 1993), diminuição da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (Hertog e col., 1993; Stein e col., 1999), redução da síntese de endotelina (Corder e col., 2001), aumento na expressão e atividade da NO sintase endotelial (eNOS) (Wallerath e col., 2003), ação antioxidante (Frankel e col., 1993;

Hertog e col. 1993; Soares de Moura e col., 2002), melhora da disfunção endotelial (Stein e col., 1999) e ação anti-hipertensiva (Frankel e col., 1993; Soares de Moura e col., 2002). Os efeitos benéficos do consumo de vinho são atribuídos ao etanol, já que outras bebidas alcoólicas também mostram ser benéficas, e também aos polifenóis presentes no vinho tinto, tais como resveratrol e flavonóides, sendo que mais de 2/3 do consumo dietético de polifenóis é de flavonóides (Stampfer e col., 1988; Wei e col., 2000; Zern & Fernandez, 2005).

1.6.1 Mecanismos de ação cardioprotetora do vinho tinto

A disfunção endotelial aparece no estado precoce de diversas doenças cardiovasculares, estando a aterosclerose, a hipertensão e o DM associados a todos os fatores de risco (Celermajer, 1997). Essa disfunção pode ser definida como um resultado de um desequilíbrio entre a liberação de fatores relaxantes e contráteis derivados do endotélio, produzindo alterações no tônus vascular, o que interfere na homeostasia sanguínea. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio são o óxido nítrico (Nitric oxide – NO) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Endothelium Derived Hiperpolarizing Factor – EDHF), enquanto os principais fatores contráteis derivados do endotélio (Endothelium Derived Contracting Factor – EDCF) são a endotelina-1 e as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Furchgott & Vanhoutte, 1989).

O benefício vascular foi, provavelmente, demonstrado pela primeira vez por Fitzpatrick e colaboradores em 1993, quando eles observaram que o vinho tinto e um extrato obtido de casca de uvas viníferas eram capazes de produzir um significativo efeito vasodilatador na aorta isolada de rato. Nesse estudo notaram

ainda, que a manutenção da integridade do endotélio é importante para a reprodução do efeito vasodilatador e que o sistema de relaxamento via NO possui importante participação neste efeito. Mais tarde, o grupo de Stoclet demonstrou que o efeito relaxante dependente do endotélio produzido pelos polifenóis é mediado pelo aumento na liberação de NO (Andriambeloson e col., 1997). Adicionalmente, outros estudos revelaram a participação também do EDHF (Soares de Moura e col., 2002; Ndiaye e col., 2003; de Moura e col., 2004).

Além disso, os polifenóis do vinho podem bloquear, através da supressão da transcrição do gene, a produção de endotelina-1, que é um potente vasoconstrictor capaz de induzir a proliferação de células musculares lisas, cuja produção excessiva é o fator chave para o desenvolvimento de doença aterosclerótica (Corder e col., 2001).

O vinho tinto também tem sido relacionado à manutenção da homeostasia. Inicialmente, Seigneur e colaboradores (1990) mostraram que os vinhos branco e tinto são capazes de inibir a agregação plaquetária, e também, aumentar os níveis de colesterol HDL. Em seguida, outros autores confirmaram estes achados, (Hansen e col., 2005; Scanella e col., 2007), inclusive em pacientes com DM2 (Bantle e col., 2008).

Segundo Gutteridge (1995) o termo antioxidante se refere a qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação do substrato. Os antioxidantes atuam por meio dos seguintes mecanismos: remoção ou diminuição da concentração local de oxigênio, remoção de íons de metais catalíticos, remoção das espécies reativas, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, ou

varredura de radicais livres iniciadores de reações de oxidação. O estresse oxidativo, que seria o desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante, desempenha um papel importante na patogênese do DM.

O termo radical livre refere-se a átomos ou moléculas altamente reativos que possuem um elétron ímpar em sua última camada (Salido & Fernández, 2002; Ferreira & Matsubara, 1997). Dentro das moléculas, os elétrons em geral se reúnem em pares. Um par de elétrons é mais estável que os elétrons isolados, e este não emparelhamento de elétrons da última camada confere uma alta reatividade a esses átomos e moléculas, provocando reações em cadeia que desestabilizam o meio molecular. Os antioxidantes, como os polifenóis do vinho tinto, estabilizam os radicais livres mediante a doação/recebimento de elétrons (Ferreira & Matsubara, 1997).

A produção excessiva de ROS dentro dos vasos tem sido considerado um importante mecanismo de disfunção endotelial (da Luz & Coimbra, 2004). A ingestão de vinho tinto parece ser acompanhada por um significativo aumento nos antioxidantes plasmáticos nos indivíduos diabéticos e não diabéticos. O extrato de casca de uva rico em procianidinas demonstrou ter alta biodisponibilidade e fornecer uma significativa proteção contra radicais livres, melhor do que as vitaminas C, E e beta-caroteno (Bagchi e col., 2000).

Já foi documentado tanto clinicamente quanto experimentalmente, que os flavonóides são capazes de aumentar a resistência à oxidação do colesterol LDL. A LDL oxidada é tóxica às células endoteliais e desempenha um importante papel na progressão do desenvolvimento de placas ateroscleróticas (da Luz & Coimbra, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que os polifenóis são capazes, ainda, de

reduzir a absorção de colesterol, devido à interação desses componentes com os transportadores de colesterol presentes na borda em escova, além de alterar as taxas de secreção de apolipoproteína B e as concentrações de triglicerídeos (Zern & Fernandez, 2005). Os mecanismos propostos pelos quais os polifenóis reduzem os níveis do colesterol plasmático são a inibição da síntese hepática de lipídeos, aumento da eliminação do colesterol via ácidos biliares, e a sua interação com os transportadores de colesterol (Zern & Fernandez, 2005; Su e col, 2006).

1.7 Relação entre consumo de vinho tinto e Diabetes Mellitus

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando os benefícios do consumo moderado de álcool por pacientes com DM2. O consumo de vinho tinto por pacientes com DM2 durante as refeições mostrou, significativamente, preservar os antioxidantes plasmáticos e reduzir a oxidação do LDL (Ceriello e col., 2001). Flanagan e col. compararam o teste de tolerância à glicose em 154 indivíduos e verificaram um relação positiva entre a sensibilidade à insulina e o consumo de álcool em indivíduos jovens, independente do sexo (Flanagan e col., 2000). O estudo de Hoorn conduziu uma coorte com 2393 participantes de 50 a 75 anos de idade acompanhados por 10 anos, e também demonstrou uma associação positiva do consumo moderado de álcool com menor risco de mortalidade e de diabetes (de Vegt e col., 2002).

Estudos em animais vêm mostrando que os polifenóis do vinho são capazes de reduzir a glicemia em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina (Al-Awwadi e col., 2004), entretanto, o mecanismo pelo qual este efeito acontece ainda não foi bem estabelecido. El-Alfy e colaboradores (2005)

demonstraram uma associação positiva do extrato obtido do caroço da uva com a proteção contra a indução de diabetes experimental por aloxânio em ratos, e esse efeito seria devido a propriedades antioxidantes dos polifenóis, evidenciado pelo aumento na produção da enzima antioxidante glutathione peroxidase no pâncreas e redução na peroxidação lipídica. Essas modificações são importantes, pois sugere-se que a hiperglicemia, característica do DM, ocasiona um aumento na quantidade de ROS presentes nas células beta pancreáticas, o que levaria a disfunção celular, uma vez que esse tecido é mais susceptível a deterioração pelas ROS, pois apresenta baixa expressão de enzimas antioxidantes comparado a outros tecidos (El-Alfy e col., 2005). Entretanto, neste estudo não foi avaliado o papel do extrato na secreção de insulina pelas células beta pancreáticas.

Mais recentemente, Su e colaboradores (2006) observaram que o resveratrol, um antioxidante do vinho, era capaz de reduzir a glicose plasmática em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, além de ter efeito hipolipidêmico. Todavia, o possível mecanismo pelo qual este antioxidante induz o efeito anti-hiperglicêmico seria a redução da ingestão alimentar e/ou redução na digestão e absorção dos alimentos no trato gastro intestinal, mas seu efeito na sensibilidade periférica à insulina não foi elucidado.

Contudo, devido ao conhecimento dos efeitos deletérios do consumo excessivo de etanol, tais como aumento do risco de insuficiência cardíaca congestiva, de arritmias, de acidente vascular cerebral hemorrágico e doença coronária (Providência, 2006), além do risco de dependência química, se faz necessário a investigação dos benefícios no tratamento do DM2 com um extrato

não alcoólico obtido da casca de uva, e dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito.

1.8 Extrato da casca de Uva (ACH09)

A partir das evidências indicativas de que o consumo moderado de vinho tinto exerce um efeito cardioprotetor, nosso laboratório resolveu investigar os possíveis efeitos benéficos de um extrato livre de álcool obtido de casca de uva. Nossos estudos prévios demonstram que o Extrato da Casca de Uva ACH09 tem ação anti-hipertensiva, uma vez que sua administração oral em ratos hipertensos induzidos por N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) reduziu os valores de pressão sistólica, média e diastólica. Além disso, o ACH09 induziu uma vasodilatação dependente do endotélio em leito vascular mesentérico isolado e inibiu a peroxidação lipídica, estimada pela produção de malondialdeído em microsomas hepáticos desses animais, mostrando o efeito anti-hipertensivo, vasodilatador e antioxidante do extrato (Soares de Moura e col., 2002).

Em 2004, demonstramos que o extrato tem ação vasodilatadora em vasos isolados de animais experimentais e que esses efeitos vasodilatador e anti-hipertensivo eram provavelmente dependentes da liberação do EDRF pelas células endoteliais associados ao NO, uma vez que o uso de L-NAME, que é um análogo competitivo do substrato da biossíntese de NO, a L-arginina, ou seja, um inibidor da liberação de NO, reduziu o efeito vasodilatador do extrato (Soares de Moura e col., 2004). Mais tarde, verificamos que os canais de potássio ativados por cálcio desempenham um importante papel no efeito vasodilatador do extrato

de casca de uva, já que a resposta vasodilatadora foi reduzida após tratamento com caribdotoxina e apamina, que são bloqueadores destes canais (Madeira e col., 2005).

Recentemente, observamos que o extrato da casca de uva diminui a resistência à insulina quando administrado oralmente em ratas grávidas com pré eclâmpsia induzida pelo L-NAME, verificada por clampeamento e relação insulina/glicose (Soares de Moura e col., 2007). A partir desses achados e dos trabalhos epidemiológicos e experimentais encontrados na literatura relacionando vinho tinto com proteção do DM, decidimos investigar as possíveis ações do extrato de casca de uva no metabolismo glicídico.

1.8.1 Características gerais das uvas

A uva é o fruto da videira ou vinha, planta que possui a seguinte classificação na sistemática botânica:

ORDEM	Ramnídea
FAMÍLIA	Vitácea
SUB-FAMÍLIA	Ampelídea
GÊNERO	<i>Vitis</i>
SUB-GÊNERO	<i>Euvinis</i>

Existe, ainda, a classificação de acordo com as espécies que podem ser inúmeras, tais como, *Vitis vinifera*, *V. rupestris*, *V. aestivalis*, *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. cinérea*, etc. Cada uma dessas espécies possui muitas variedades, denominadas cepas ou castas.

As uvas que originam os vinhos finos são da espécie *V. vinifera* de origem européia e que possui inúmeras castas, como a Cabernet Sauvignon, a Merlot, a Chardonnay, etc. As demais espécies são denominadas americanas, sendo adequadas à elaboração de vinhos de mesa, vinho colono, vinho de garrafão e suco de uva. Essas espécies também possuem muitas variedades, cujos melhores exemplos no Brasil são a Niágara e a Isabel que até a década de 80 eram as únicas castas utilizadas na elaboração dos vinhos brasileiros.

1.8.2 Características gerais dos polifenóis

O ACH09 é um extrato hidro-alcoólico da casca de uvas viníferas, *Vitis vinifera*, rico em polifenóis. Estes são importantes para pigmentação, reprodução, crescimento e para proteção contra patógenos nas plantas (Zern & Fernández, 2005). Dentre os alimentos de origem natural onde os polifenóis são encontrados temos frutas e vegetais, sendo os mais ricos as uvas viníferas.

Os polifenóis podem ser definidos como substâncias aromáticas, de origem natural, que podem conter uma ou mais hidroxilas (Waterhouse, 2002). Eles podem ser agrupados em duas categorias, designadas flavonóides e não-flavonóides. Os flavonóides compreendem a maioria dos polifenóis derivados da casca da uva vinífera, e podem ser definidos como compostos que contém um sistema formado por três anéis, sendo que dois anéis são aromáticos.

De acordo com o grau de oxidação os flavonóides podem ser classificados em diversas subclasses, sendo as três maiores, as dos flavanóis (ex: catequina e epicatequina), flavonóis (ex: quercetina e kaempferol) e das antocianinas e/ou antocianidinas (ex: malvidina-3-glucosídeo e delphinidina). Os não flavonóides

podem ser classificados em ácidos hidroxinâmicos (ex: ácido caféico), ácidos benzóicos (ex: ácido gálico), taninos hidrolizáveis (ex: vescaligina) e estilbenos (ex: resveratrol) (Figura 3) (Waterhouse, 2002).

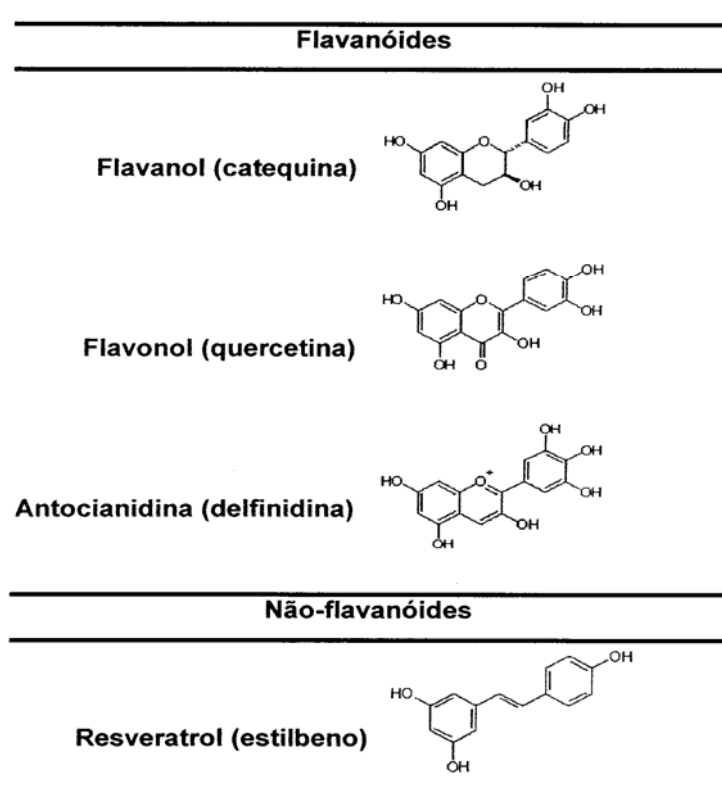


Figura 3 – Estrutura química de alguns polifenóis

A concentração total de polifenóis nas uvas viníferas, extraídos pelo método de Follin-Ciocalteu, pode variar entre 1,2 a 4,1 g/Kg (Mattivi e col., 2002). Acredita-se, ainda, que a concentração das substâncias presentes nas uvas, pode variar de acordo com o tipo de uva, solo onde são cultivadas, os métodos de cultivo, o tempo de fermentação, o tempo de maturação do vinho e as condições climáticas, como exposição a luz solar (Ryan & Revilla, 2003, Zafrilla e col, 2003).

Em estudos previamente realizados, detectamos que o ACH09 liofilizado tem uma concentração de fenóis, pelo método de Follin-Ciocalteu, de 55,5 mg/g (Soares de Moura e col., 2002). As partes da uva que são mais ricas em polifenóis são a casca e o caroço, porém como a casca responde por um maior volume da uva que o caroço, fica mais vantajosa, economicamente, sua futura utilização pela indústria farmacêutica.

2. Objetivo geral

Avaliar o possível efeito do extrato da casca de uva (ACH09) obtido das uvas *Vitis vinifera* sobre a glicemia, a resistência à insulina e o conteúdo de proteínas da cascata de sinalização da insulina em camundongos diabéticos induzidos por aloxânio.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do ACH09 sobre o peso corporal dos animais estudados.
- Estudar o efeito *in vitro* do ACH09 sobre a secreção de insulina de ilhotas pancreáticas isoladas.
 - Analisar a ação do ACH09 na glicemia de animais diabéticos e controles.
 - Avaliar o efeito do tratamento preventivo com ACH09 sobre a insulina plasmática *in vivo* de animais diabéticos e controles.
- Verificar a interferência do ACH09 na resistência insulínica dos animais diabéticos induzidos por aloxânio e dos animais controles.
- Comparar os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total dos animais estudados.
- Avaliar a expressão do conteúdo total das proteínas da cascata de sinalização de insulina em tecido muscular gastrocnemius de camundongos.

3. Metodologia

3.1 - Preparação do extrato de casca de uva (ACH09)

As uvas viníferas foram lavadas em água corrente e as cascas foram separadas das polpas. Aproximadamente 100 g de cascas de uva foram fervidas em 400 ml de água destilada por 5 minutos e posteriormente o preparado foi triturado. Na etapa seguinte, 400 ml de etanol foram adicionados ao decoto, a solução foi homogeneizada por 4 horas e acondicionada em frasco de vidro de cor escura e este mantido no refrigerador a 4°C por 20 dias. O extrato hidro-alcoólico de casca de uva foi então obtido e posteriormente filtrado através de filtro de papel Whatman nº 1. O etanol foi evaporado, em regime de baixa pressão a 55° C, e o extrato liofilizado e congelado a -20° C até o seu uso. Constatou-se que para cada 100 g de cascas de uva, obtinha-se a formação de cerca de 8,9 g de extrato liofilizado.

3.2 Isolamento e perfusão das ilhotas pancreáticas *in vitro*

Camundongos suíços, pesando entre 25 e 30 g, recebendo água e ração própria para roedores *ad libitum* foram utilizados nesta análise. Os animais foram anestesiados com Tiopental (30 mg/kg de peso) e foi realizada uma laparotomia com abertura da região abdominal à torácica, permitindo o isolamento do pâncreas, através da localização do baço no animal. O pâncreas foi então fixado em uma placa de petri revestida de parafina escura, e as ilhotas pancreáticas isoladas por microdissecção com auxílio de uma lupa e tesouras, e pinças microcirúrgicas.

Após coletadas, as ilhotas pancreáticas (40 ilhotas/pâncreas) foram acondicionadas em câmara de perfusão swinnex-13 (Millepore®, EUA) com fluxo mantido em 1 ml/ minuto por bomba peristáltica (Amersham®, EUA). Foi utilizada solução de Krebs (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 2.56 mM CaCl₂ e 1.13 mM MgCl₂) borbulhado com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) a 37° C acrescida de glicose a 2,8 mmol/L (Vetec®, Brasil) para realizar a perfusão das ilhotas por 40 minutos objetivando a adaptação das mesmas e a secreção basal de insulina. Após o período de estabelecimento das condições basais, houve uma troca do fluxo perfundido nas ilhotas e estas passaram a receber durante 30 minutos, como condições experimentais, solução de Krebs com glicose a 16,7 mmol/L (grupo controle, n = 5) ou glicose a 16,7 mmol/L acrescida de ACH09 (50µg/ml) (grupo ACH09, n = 5), ambas a 37° C e borbulhado com carbogênio, a fim de se determinar a secreção de insulina estimulada pela glicose ou pela glicose acrescida de ACH09. A concentração de ACH09 estimulante foi determinada a partir de experimentos piloto realizados previamente em nosso laboratório.

Os perfusatos foram coletados no tempo zero (momento em que houve a troca da solução basal pela solução estimulatória) e a cada 5 minutos durante a estimulação com glicose ou glicose+ACH09. Os perfusatos coletados foram congelados a -20° C para posterior análise da insulina por radioimunoensaio utilizando Kit ¹²⁵I RIA (MP Biomedicals, NY, USA). Os resultados foram expressos como área sob a curva correspondente a secreção de insulina durante as condições experimentais (30 minutos).

3.3 Modelo animal de Diabetes Mellitus e protocolos experimentais

Foram utilizados camundongos suíços com peso entre 25 e 30 g foram obtidos do Instituto Vital Brazil e mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia/ IBRAG/ UERJ, em temperatura média de 23°C-25 °C e com ciclo de luminosidade de 12 hs (claro e escuro). Os animais receberam ração industrializada específica para roedores (NUVILAB[®]) com 22% de proteína *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os animais foram divididos em 4 grupos ($n \geq 6$ em cada grupo) de acordo com o tratamento a que foram submetidos: Grupo Controle, Grupo ACH09, Grupo Aloxiônio e Grupo Aloxiônio+ACH09.

Para indução do Diabetes Mellitus tipo 2, os animais dos grupos Aloxiônio e Aloxiônio+ACH09 receberam intraperitonealmente 3 doses alternadas de 200 mg/kg de peso de “Alloxan Monohydrate” (Sigma[®], USA) imediatamente após ter sido diluído em salina (dia 0). Essa dose de aloxiônio foi previamente testada e foram considerados diabéticos aqueles animais com a glicemia acima de 350 mg/dl.

O tratamento com ACH09 do grupo Aloxiônio+ACH09 começou 7 dias antes da administração do aloxiônio (dia -7) e foi mantida até o final do experimento (dia 19). Esses animais receberam 200 mg/kg de peso de ACH09 dissolvido na água de beber. O consumo hídrico de ACH09 dos animais foi avaliado a cada três dias.

O grupo controle recebeu somente água livremente durante todo o experimento. E por último, o grupo ACH09 recebeu o extrato (200 mg/kg de peso)

dissolvido na água de beber desde o dia -7 até o dia 19. O sacrifício de todos os animais que participaram do estudo foi feito no dia 19.

Os animais foram analisados quanto ao peso corporal, triglicerídeos totais, colesterol, glicemia, níveis de insulina de jejum e conteúdo das seguintes proteínas da cascata de sinalização da insulina: IR, IRS-1, PI3-K, Akt, pAkt e GLUT-4 no músculo gastrocnemius. Todos os experimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética de Experimentos Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.4 Análises de peso corporal

Todos os animais iniciaram o estudo com peso entre 25 e 30 g e este foi acompanhado ao longo de todo o período experimental.

3.5 Análises Bioquímicas

3.5.1 Análise da glicose plasmática

A glicemia de jejum foi dosada através do glucômetro (Accu-check - Roche®) no dia -7 (antes do início do tratamento com ACH09 no grupo Aloxânio+ACH09 e no grupo ACH09), no dia 0 (antes da indução do Diabetes nos grupos Aloxânio e Alôxanio+ACH09) e a cada 4-5 dias em todos os grupos até o final do experimento no 19º dia.

3.5.2 Análise da Insulina plasmática

No 19º dia de experimento, após 16 horas de jejum, os animais foram anestesiados por administração de Tiopental (30 mg/kg de peso) intra peritoneal e

heparinizados (Heparina - 5000 UI/kg). Após o início do efeito da anestesia foi feita uma laparostomia com abertura da região abdominal à torácica para retirada de 2 ml de sangue com seringa previamente heparinizada. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 4° C. Posteriormente o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue e mantido em freezer a -20° C até o momento das análises bioquímicas. O tecido muscular gastrocnemius foi removido e congelado imediatamente em nitrogênio líquido e ao final do experimento armazenado no freezer -70° C.

A dosagem da insulinemia de jejum foi realizada por radioimunoensaio nos plasmas coletados no 19º dia (após o sacrifício) através de kit para diagnóstico de insulina (MP Biomedicals ¹²⁵I RIA Kit). Foram incubados, a temperatura ambiente, 50 µl de plasma ou do padrão de insulina (0; 5,5; 15; 35; 70; 175; 310 µUI/mL), em duplicata, com 950 µl de Insulina ¹²⁵I liofilizada reconstituída com água destilada, por 18 horas em tubos de polipropileno com anticorpo anti-insulina porcina adsorvido à parede do tubo. Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado e o tudo lavado por 2 vezes com aproximadamente 4 ml de água destilada. A fração radioativa adsorvida foi mensurada em contador Gama (Packard® Cobra Auto-Gamma ®) e os valores expressos da curva padrão em contagem por minuto foram interpolados na concentração dos valores de insulina padrão em logarítimo. A obtenção dos valores de insulina plasmática das amostras foram calculados a partir da função da regressão logarítima através do software Microsoft Excell ® e os resultados expressos em µUI/ ml.

3.5.3 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através do índice de HOMA (Homeostasis Model Assessment) calculado pela fórmula: insulina de jejum ($\mu\text{UI/ml}$) x glicose de jejum (mmol/L) / 22,5 (Matthews, 1985).

3.5.4 Triglicerídios do plasma

Os triglicerídeos totais do plasma de todos os animais do estudo foram determinados através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Triglicérides-PP (Analisa®, Brasil). Em 10 μl de plasma dos camundongos foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo lipase > 100 U/ ml, glicerol quinase > 1,5 U/ ml, glicerol-3P-oxidase > 4 U/ ml e peroxidase > 0,8 U/ L. Após aquecimento em banho a 37° C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (glicerol equivalente a 200 mg/dl de trioleína) em espectrofotômetro (Shimadzer®, Japão) a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

Fc: Fator de calibração

Cp: Concentração do Padrão

Ap: Absorbância do Padrão

Ca: Concentração da amostra

Aa: Absorbância da amostra

3.5.5 Colesterol total do plasma

O colesterol total do plasma de camundongos controles e diabéticos foi determinado através do método colorimétrico utilizando-se “kit” comercial Colesterol-PP (Analisa®, Brasil). Em 10 µl de plasma dos camundongos foi adicionado 1 ml do reagente de cor contendo colesterol estearase > 200 U/ L, colesterol oxidase > 100 U/ L e Peroxidase > 800 U/ L. Após agitação em vortex AP 56 (Phoenix®, Brasil) e aquecimento em banho a 37° C durante 5 minutos foi realizada a leitura em duplicata da absorbância das amostras e do padrão (colesterol 200 mg/dl) em espectrofotômetro (Shimadzer®, Japão) a 500nm. Os resultados foram expressos em mg/dl e calculados através das fórmulas descritas abaixo.

$$FC = Cp / Ap$$

$$Ca = Fc . Aa$$

Fc: Fator de calibração

Cp: Concentração do Padrão

Ap: Absorbância do Padrão

Ca: Concentração da amostra

Aa: Absorbância da amostra

3.6 Biologia Molecular - Western blotting do IR, IRS-1, PI3-K, Akt, p-Akt e GLUT-4 muscular

O tecido muscular gastrocnemius dos camundongos de todos os grupos estudados, após ter sido descongelado em baixa temperatura, foi lavado em Krebs-Heinselet gelado (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,75

mM, NaHCO₃ 25 mM, EDTA 0,5 mM) com pH de 7,4 e picotado com auxílio de bisturi. Em seguida o material foi homogeneizado em solução de lise gelada (50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100 acrescentada com inibidores de proteases: 1 mM de fluoreto de metilsulfonil (PMSF), 1 μM de aprotinina, 1 μM de leupeptina) por trituração manual com auxílio de um pilão, adquirindo uma consistência quase líquida. Posteriormente, foi submetido 3 vezes a ultra-som (Virtis – Virsonic 60®) durante 15 segundos, por 10 segundos de descanso em gelo. Foi realizada uma centrifugação a 9000 rpm por 15 min a 4°C para separação dos *debris* e em seguida ultra-centrifugação (ultracentrífuga Hitachi – Himac CP70G®) a 42000 rpm por 1 hora e 30 minutos. Parte do sobrenadante (20%) foi coletado para obtenção do conteúdo total das proteínas da cascata de sinalização de insulina: IR, IRS-1, PI3-K, Akt e pAkt e GLUT-4.

Após a centrifugação, a concentração de proteínas totais foi quantificada pelo método de Lowry em placa de ELISA (Jamef®) utilizando a albumina bovina (SIGMA®) nos padrões 0,5; 1; 2 e 4 mg/ml. Em seguida, foi realizada a desnaturação das proteínas por fervura das amostras durante 5 minutos em tampão de amostra próprio.

As proteínas totais (40 μg) foram aplicadas sobre um gel a 10% de poliacrilamida (30% acrilamida, 1.6% bis-acrilamida, 10% APS, 5 μl Temed diluídos em tampão Tris 1,5 mM, 10% de SDS) juntamente com um padrão de peso molecular (Rainbow-Sigma®, USA) em cuba de eletroforese (Hoefer®) para separação protéica, e a seguir, as proteínas foram transferidas para uma

membrana de nitrocelulose (Hybond – P Amersham Biotech®) por eletrotransferência.

A detecção protéica específica foi realizada após incubação da membrana de nitrocelulose por 1 hora em albumina sérica bovina 2% diluída em Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 0,01% Tween-20). Em seguida, a membrana de nitrocelulose, foi incubada com anticorpo primário para IR, IRS-1, PI3-K subunidade p85, Akt, p-Akt Ser-473, GLUT-4 e actina (Santa Cruz Biotech) na diluição 1:1000 durante período mínimo de 12 horas. Para imunodeteccção foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário apropriado biotilado (Santa Cruz Biotech - diluição 1:1000), seguida de incubação com estreptavidina (Caltag Laboratories®, Burlingame, CA, USA) também na diluição 1:1000 por mais 1 hora. A revelação das proteínas foi realizada por 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma®). As bandas (n = 5) foram quantificadas segundo sua densidade, utilizando-se o software Image J (NIH, USA).

3.7 - Análise estatística

Todos os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média do número de camundongos. Foi utilizado o teste *t*-student para comparação dos pares de grupos, considerando valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significantes.

4. Resultados

4.1 Secreção de insulina *in vitro*

Com o objetivo de investigar a capacidade do ACH09 em estimular a secreção de insulina, 40 ilhotas isoladas de camundongos foram perfundidas com glicose ou glicose+ACH09 durante 30 minutos. Não houve diferença significativa na área sob a curva da secreção de insulina *in vitro* entre os animais estudados (figura 4).

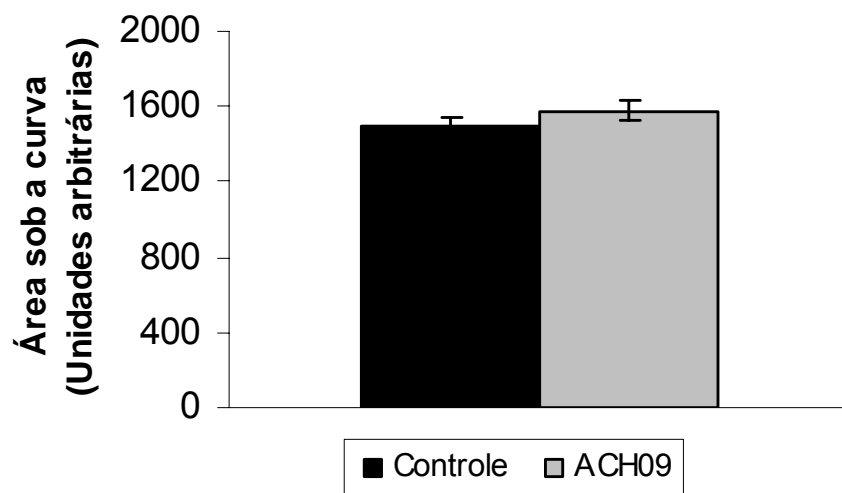


Figura 4 – Secreção de insulina *in vitro* de 40 ilhotas isoladas de camundongos durante 30 minutos, estimuladas com glicose tratadas ou não com ACH09.

4.2 Peso corporal

Os dados encontrados indicam que o peso corporal médio dos animais de cada grupo não se alterou ao longo do experimento (figura 5).

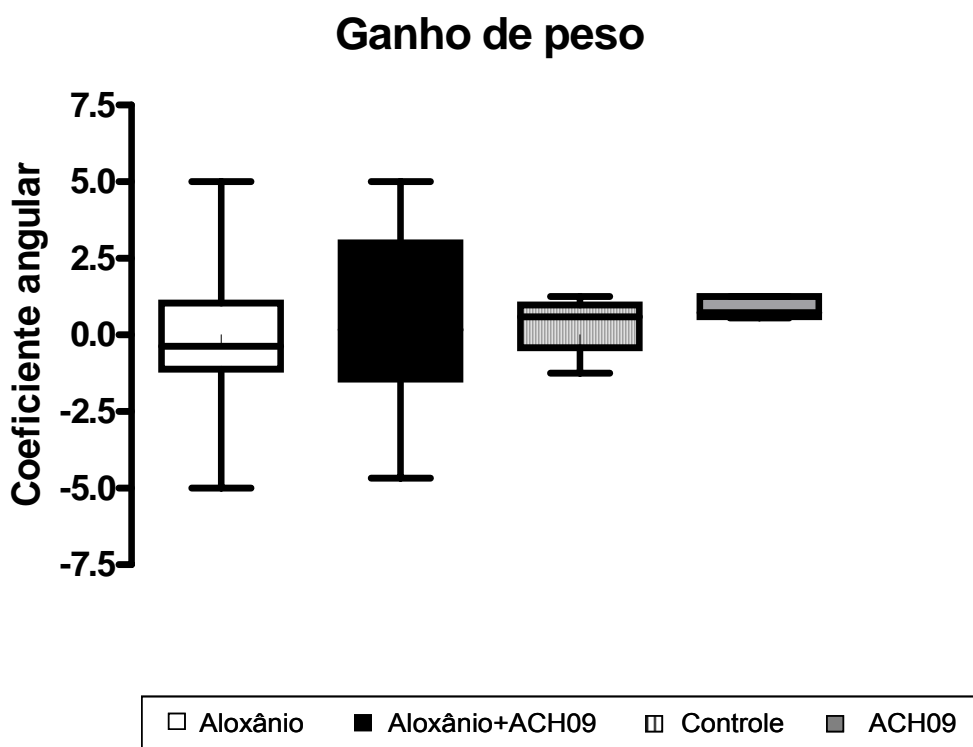


Figura 5 – Box wiskar dos coeficientes angulares da regressão linear do ganho de peso dos camundongos durante o experimento.

4.3 Glicemia

As glicemias no dia 0 e no dia 19 dos 4 grupos foram respectivamente: grupo Aloxânio: $83,4 \pm 3$ mg/dl e $328,7 \pm 45$ mg/dl; grupo Aloxânio+ACH09: $90,3 \pm 4$ mg/dl e $143,5 \pm 15$ mg/dl; grupo Controle: $62,7 \pm 5$ mg/dl e $100,8 \pm 3$ mg/dl; e grupo ACH09: $67,7 \pm 5$ mg/dl e $70,3 \pm 4$ mg/dl. Esses resultados mostram uma diferença significativa entre os grupo Aloxânio e Aloxânio+ACH09 ($p < 0,0006$) e os grupos Controle e ACH09 ($p < 0,001$), indicando ação hipoglicemiante e anti hiperglicêmica do extrato de casca de uva ACH09 (figuras 6 e 7).

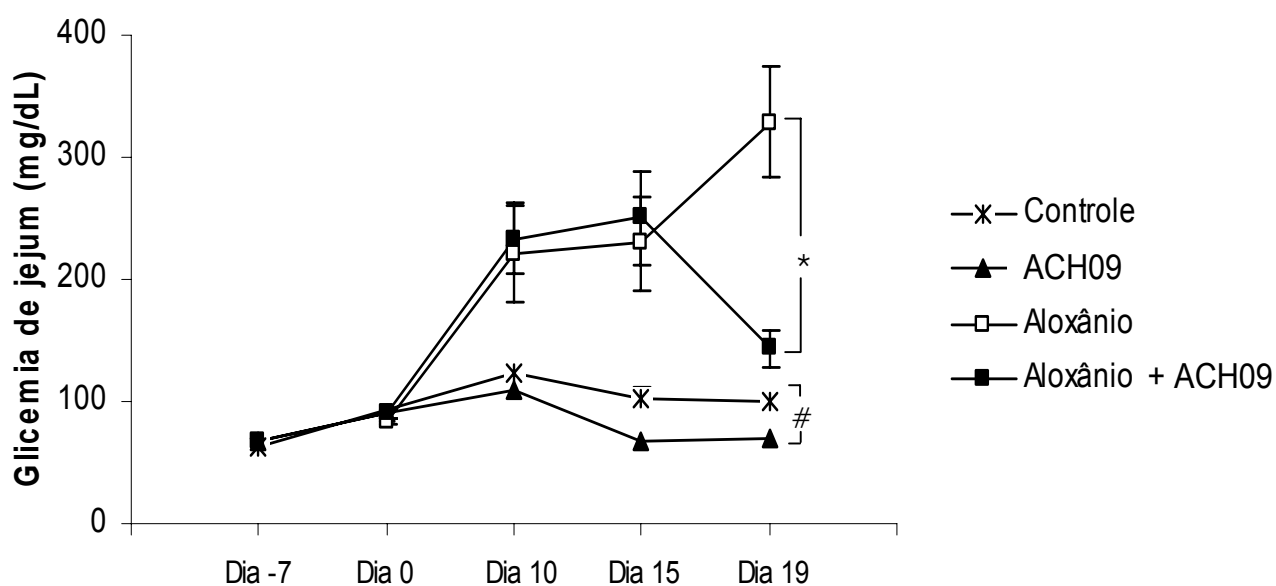


Figura 6 – Efeito do tratamento com ACH09 na glicemia de camundongos controle e diabéticos induzidos por aloxânio (indução começando no dia 0). Valores estão expressos em média \pm erro padrão de ≥ 6 animais por grupo. * $P < 0.0006$, # $P < 0.001$ vs respectivo controle.

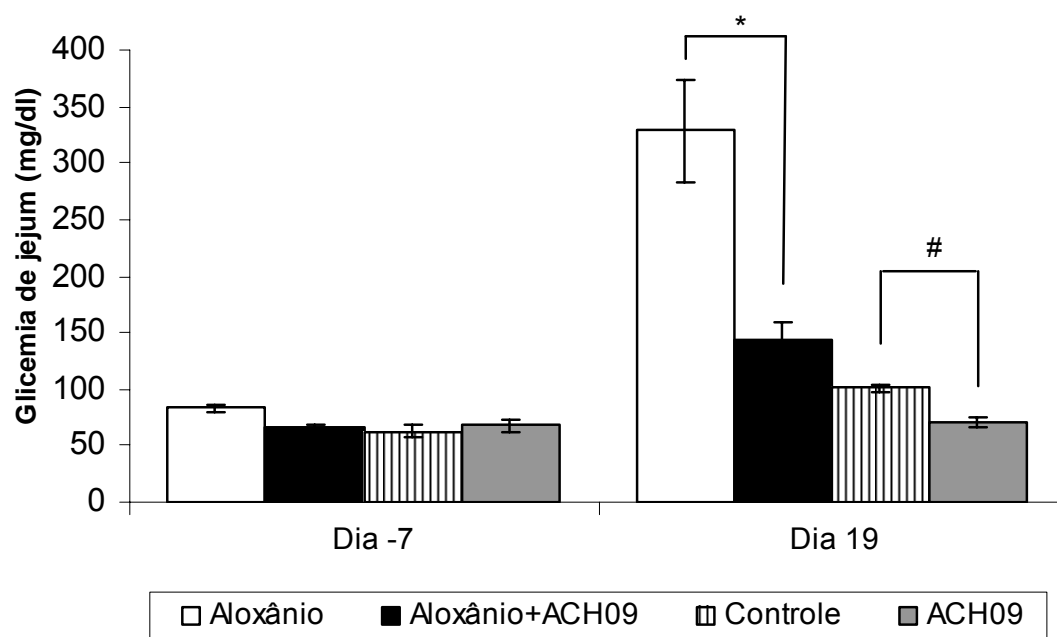


Figura 7- Representação em barras da glicemia de jejum no dia -7 e 19.

* $P < 0,0006$, # $P < 0,001$.

4.4 Insulinemia

O tratamento com aloxânio induziu uma diminuição nos níveis plasmáticos de insulina do grupo Aloxânio comparado ao grupo Controle (grupo Aloxânio: $17,6 \pm 1,6$ ng/ml x grupo Controle: $26,1 \pm 4,3$ ng/ml). Entretanto, o ACH09 não modificou os níveis de insulina de jejum mensurados no 19º dia de estudo, indicando não ser este o mecanismo desencadeante da redução glicêmica observada nos grupos aloxânio+ACH09 e grupo ACH09 (figura 8).

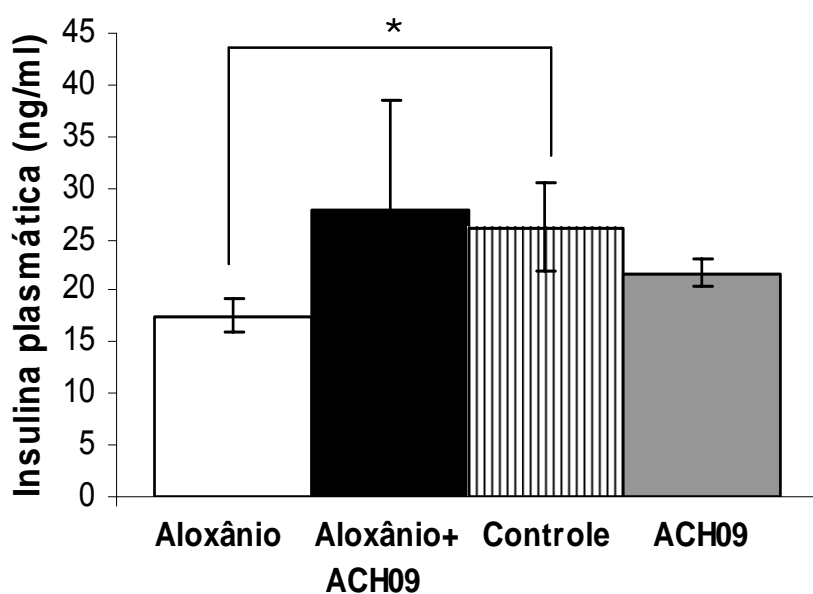


Figura 8 – Insulinemia de jejum no 19º dia de estudo. *P < 0,05.

4.5 Análise da sensibilidade à insulina

Através do índice de HOMA, utilizado para analisar a sensibilidade à insulina, observamos que no grupo Aloxânio houve aumento da resistência à insulina (grupo Aloxânio: $18,09 \pm 1,9$ X grupo Controle: $6,44 \pm 1,0$). Já os grupos Aloxânio+ACH09 e ACH09 apresentaram valores de índice de HOMA significativamente menores que os grupos Aloxânio e Controle, respectivamente (grupo Aloxânio: $18,09 \pm 1,9$; grupo Aloxânio+ACH09 $9,17 \pm 2,7$; grupo Controle: $6,44 \pm 1,0$; grupo ACH09: $3,73 \pm 0,8$; $p < 0,01$), sugerindo um aumento na sensibilidade à insulina como resultado do tratamento com ACH09 (figura 9).

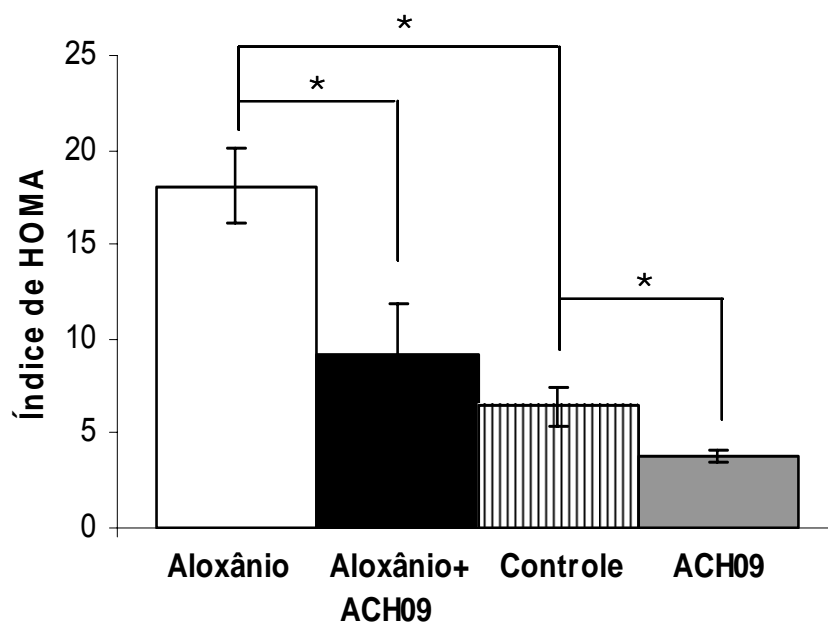


Figura 9 – Índice de HOMA considerando a glicemia e a insulinemia do dia 19.

* $P < 0,01$.

4.6 Análise de lipídeos plasmáticos

4.6.1 Análise de triglicerídeos totais

Não houve diferença nos níveis plasmáticos de triglicerídeos entre os animais estudados (figura 10).

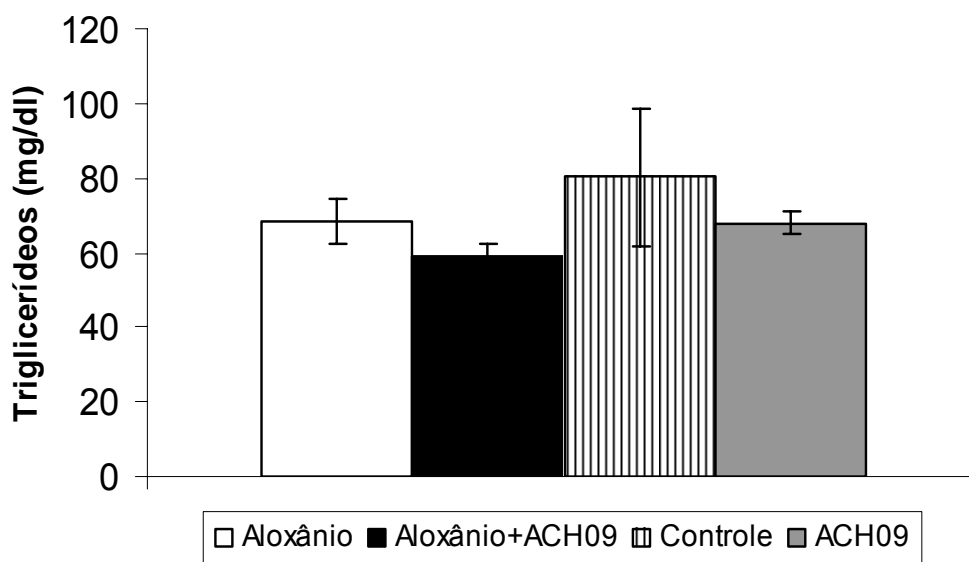


Figura 10 – Triglicerídeos plasmáticos no 19º dia após a indução do Diabetes.

4.6.2 Colesterol plasmático

A administração oral de ACH09 nos animais diabéticos do grupo Aloxânio+ACH09 resultou em diminuição significativa dos níveis plasmáticos de colesterol total comparado aos níveis dos animais do grupo Aloxânio (grupo Aloxânio: $52,5 \pm 4,2$ mg/dl x grupo Aloxânio+ACH09: $31,6 \pm 3,6$ mg/dl). Entre os grupos controle e ACH09 não houve diferença na colesterolemia (figura 11).

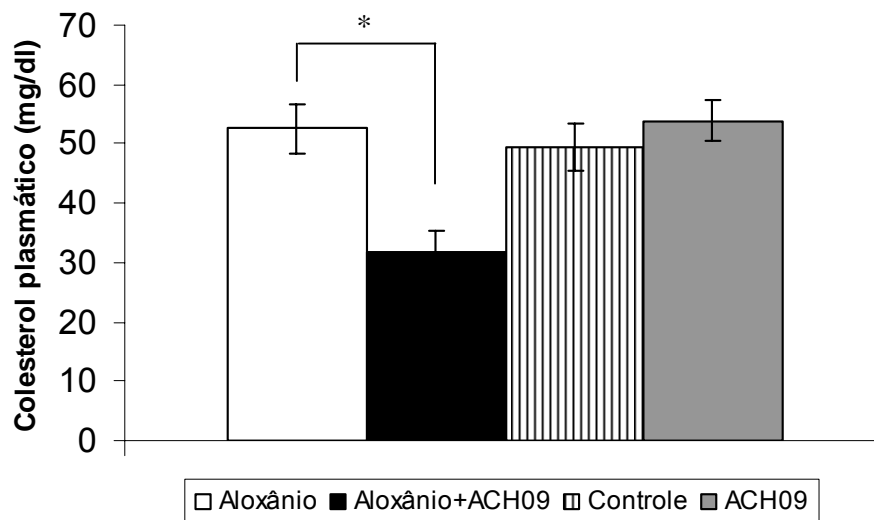


Figura 11 – Colesterol total plasmático no 19º dia após a indução do Diabetes.

* $P < 0,05$.

4.7 Biologia Molecular – Western Blotting

4.7.1 Conteúdo de receptor de insulina (IR)

Os valores do conteúdo total de receptor de insulina foram significativamente aumentados no grupo Aloxânio+ACH09 ($97,89 \pm 4,7\%$) comparados ao grupo Aloxânio ($74,32 \pm 7,3\%$) (figura 12).

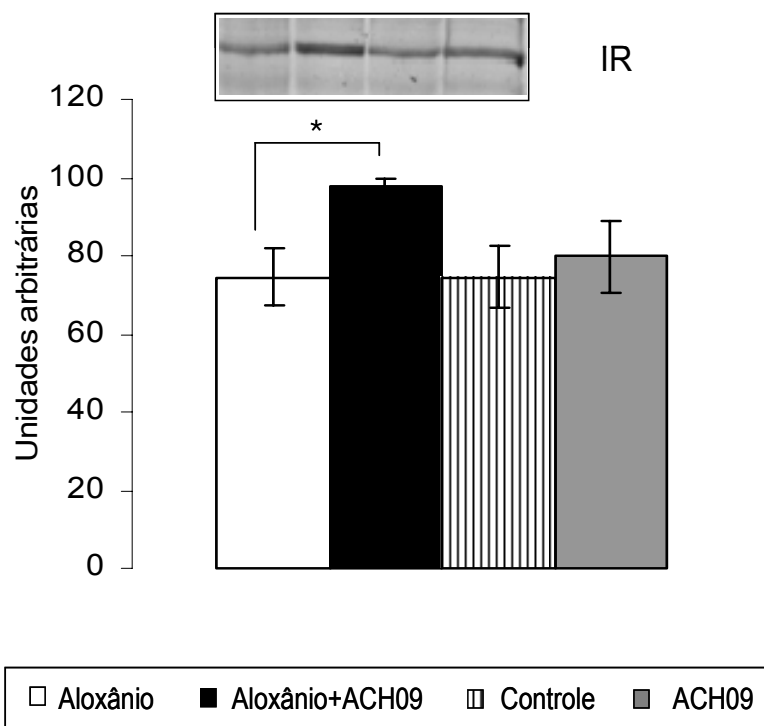


Figura 12 – Receptor de insulina (IR) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5). *P<0,05.

4.7.2 Conteúdo de Substrato do Receptor de Insulina (IRS-1)

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto ao conteúdo total do substrato de receptor de insulina (IRS-1) no músculo gastrocnemius (figura 13).

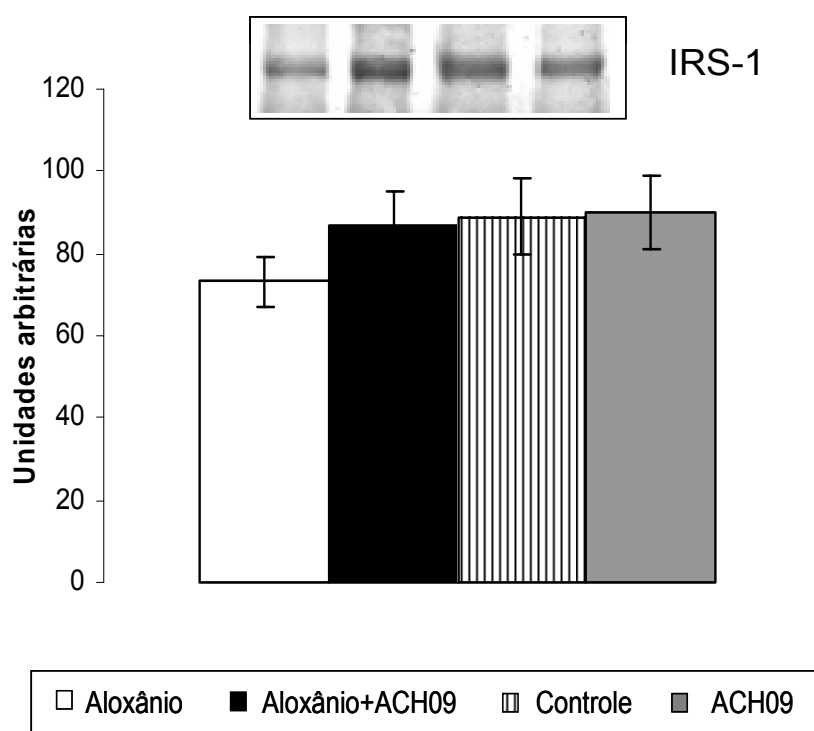


Figura 13 – Substrato de receptor de insulina (IRS-1) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia de estudo. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5).

4.7.3 Conteúdo de fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3-K)

Não houve diferença significativa no conteúdo total de PI3-K entre os grupos estudados (figura 14).

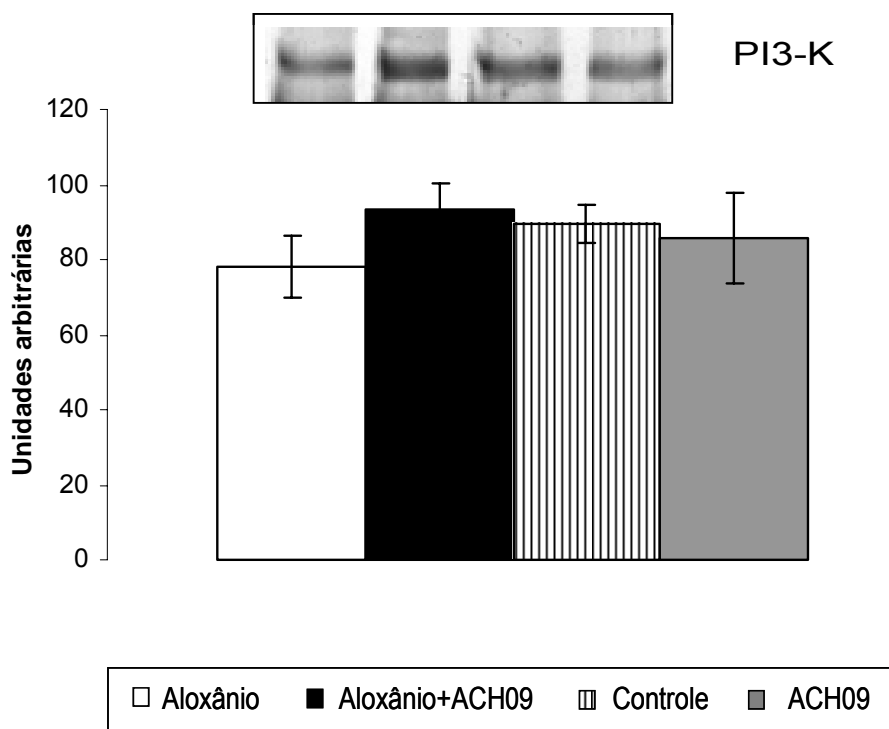


Figura 14 - Fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3-K) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5).

4.7.4 Conteúdo de AKT total

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto ao conteúdo total de Akt (figura 15).

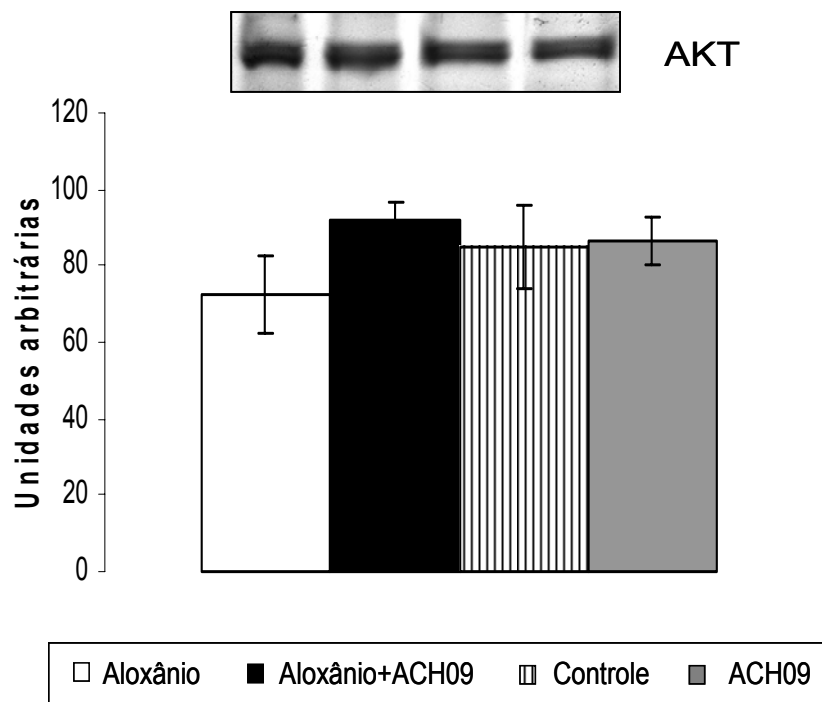


Figura 15 - Akt de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5).

4.7.5 Conteúdo de p-AKT

Embora não tenha havido diferença nos valores de Akt, quando se avaliou a Akt fosforilada, observou-se que os valores foram significativamente aumentados no grupo Aloxânio+ACH09 ($93.0 \pm 7\%$) quando comparados ao grupo Aloxânio ($44.1 \pm 11\%$) (figura 16).

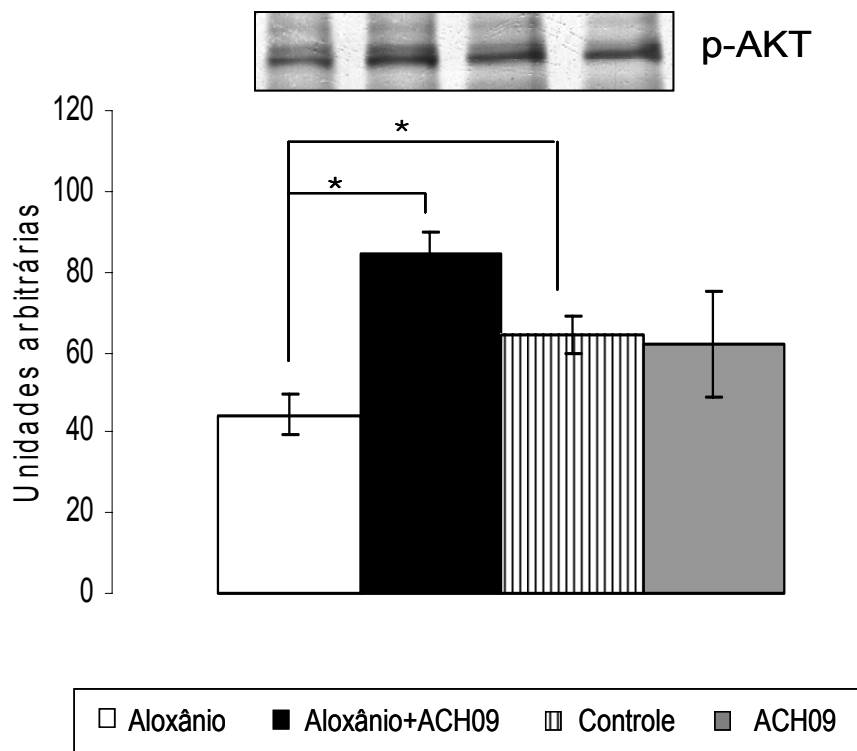


Figura 16 – Akt fosforilada de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09 no 19º dia de estudo. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n=5). *P < 0,05.

4.7.6 Conteúdo total de GLUT-4

Foi observada uma significativa redução no conteúdo de GLUT-4 no músculo gastrocnemius dos animais diabéticos comparados aos animais do grupo controle (grupo Aloxânio: $51.9 \pm 2,4\%$ x grupo Controle: $69,18 \pm 5,5\%$). Entretanto, o tratamento com o ACH09 induziu um significativo aumento no conteúdo de GLUT-4 no grupo Aloxânio+ACH09 ($72,49 \pm 9,4\%$) comparado ao grupo Aloxânio ($51.9 \pm 2,4\%$). Um aumento similar ocorreu no grupo tratado com ACH09 ($95,16 \pm 4,8\%$) comparado ao grupo Controle ($69,18 \pm 5,5\%$) (figura 17).

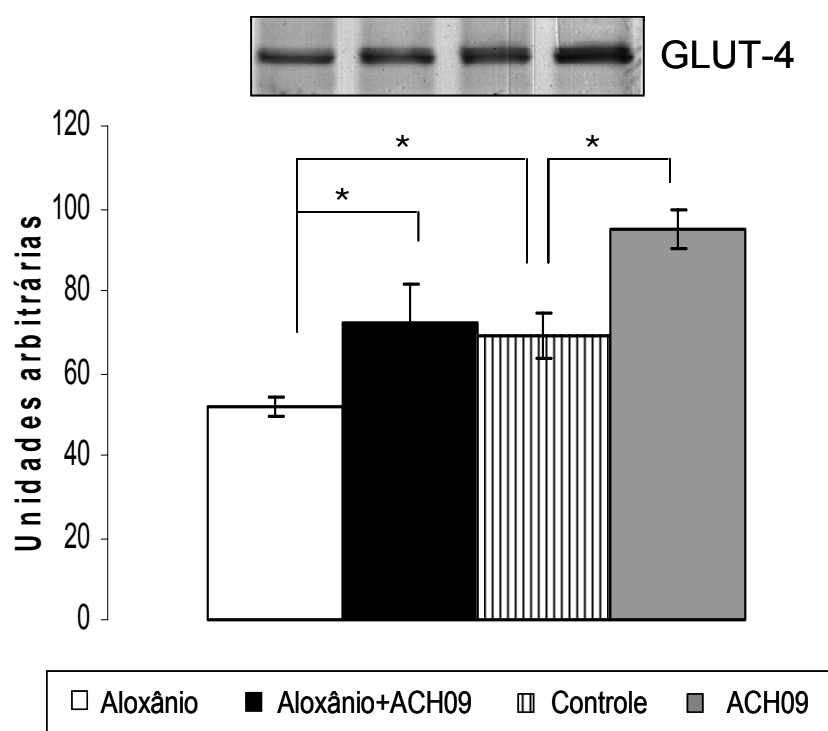


Figura 17 – Transportador de glicose (GLUT-4) de animais diabéticos e controles tratados ou não com ACH09. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=5). *P < 0,05.

5. Discussão

Os presentes resultados demonstram que o tratamento de camundongos diabéticos e controles com o ACH09 induziu a um efeito anti-hiperglicemiante e hipoglicemiante, além de diminuir a resistência à insulina induzida pelo aloxânio e aumentar a sensibilidade à insulina de animais controles, possivelmente pelo aumento do conteúdo total das proteínas IR, p-Akt e GLUT-4 da cascata de sinalização da insulina em músculo esquelético.

O DM é uma das maiores causas de morte da maioria dos países desenvolvidos. O DM2 constitui aproximadamente 85 a 95% de todos os pacientes diabéticos nestes países, e este percentual é ainda maior nos países em desenvolvimento. Complicações do DM, tais como doença vascular periférica, neuropatia diabética, amputações, insuficiência renal e cegueira têm resultado em redução da expectativa de vida e aumento dos custos para o setor saúde (IDF, 2003). A organização mundial de Saúde estima que na década atual ocorrerá um aumento de 46% na incidência mundial de DM (Zimmet e col., 2001). Desta forma, são mandatórios estudos objetivando obtenção de meios alternativos para prevenção e tratamento do DM2.

A literatura relata que o consumo moderado de vinho tinto é benéfico para prevenção e tratamento do DM (Nettleton e col., 2006; Wannamethee e col., 2003). Estudos mostram que esses efeitos podem estar associados aos polifenóis, já que eles foram capazes de reduzir a glicemia e a ingestão alimentar em animais diabéticos e não diabéticos (Al-Awwadi e col., 2004), reduzir o dano oxidativo às células beta pancreáticas causado pela indução do Diabetes experimental (El-Alfy

e col., 2005) e diminuir a resistência à insulina em pacientes com DM2 (Napoli e col., 2005).

Entretanto, apesar de diversos estudos demonstrarem efeitos salutares do vinho tinto, não há justificativa para abstermos iniciarem o consumo de bebidas alcoólicas como uma medida preventiva (Szmitko & Verma, 2005), considerando o risco de dependência química ao etanol. Portanto, o estudo do extrato de casca de uva, rico em polifenóis, representa uma alternativa mais saudável, uma vez que preserva as vantagens cardiovasculares de um consumo moderado de vinho tinto, sem o efeito deletério do etanol.

A indução de Diabetes experimental em camundongos foi realizada com o aloxânio, que é uma das substâncias mais utilizadas. Sua toxicidade nas células beta pancreáticas é o somatório de vários processos como oxidação de compostos celulares contendo radicais sulfidrilas (SH), inibição da glicoquinase, geração de radicais livres e distúrbios na homeostase do cálcio (Szkudelski, 2001), levando a redução da secreção de insulina no pâncreas e também diminuição da sensibilidade à insulina (Boylan e col., 1992). Observamos que o DM induzido por aloxânio nos camundongos foi acompanhado por uma significativa elevação da glicemia de jejum e redução nos níveis plasmáticos de insulina.

O presente estudo demonstrou pela primeira vez um efeito anti-hiperglicemiante, *in vivo*, do extrato da casca de uva vinífera em camundongos diabéticos induzidos por aloxânio, considerando que a glicemia dos animais tratados com aloxânio+ACH09 reduziu a valores próximos do grupo controle. Estudos anteriores já haviam demonstrado, que o extrato de uva, rico em

procianidinas, obtido das sementes promoviam redução do nível de glicose plasmática, porém somente quando administrado associado a baixas doses de insulina (Pinent e col., 2004), portanto, sugere-se que o extrato obtido da casca de uva pode ser mais eficaz do que o obtido da semente.

Inicialmente, propusemos que o efeito anti-diabético do ACH09 encontrado em nosso trabalho poderia ser justificado por um efeito antioxidante protetor nas células pancreáticas, restabelecendo a secreção de insulina, uma vez que trabalhos previamente realizados em nosso laboratório já haviam observado essa capacidade antioxidante do extrato em outros tecidos. Entretanto, o ACH09 não modificou a secreção de insulina pelas células beta *in vitro*, e corroborando com este achado, assim como outros autores (Su e col., 2006) ele também não aumentou, *in vivo*, os níveis plasmáticos de insulina no grupo Aloxânio+ACH09 e no grupo ACH09 ao final do estudo, indicando que, o efeito anti-diabético observado possivelmente ocorre por outro mecanismo que não a modulação da secreção de insulina pancreática. Entretanto, nós acreditamos que a extensão da lesão pancreática induzida pelo Aloxânio seja variável, o que pode ter resultado em um desvio padrão elevado, interferindo na análise estatística. Deste modo, o efeito anti-diabético do ACH09 poderia ser explicado não particularmente pela sua ação no pâncreas, porém através da sua modulação na cascata de sinalização da insulina e a regulação do transporte de glicose com consequente aumento na sensibilidade à insulina.

A resistência à insulina do DM2 é caracterizada por defeitos em diversos níveis da cascata de sinalização de insulina, com diminuição da concentração do receptor de insulina e da atividade quinase, redução da concentração de IRS-1 e

atividade da PI3-K e diminuição também da translocação de GLUT-4 (Saltiel & Kahn, 2001). O GLUT-4 é o maior transportador envolvido no transporte de glicose estimulado pela insulina, desta forma, a taxa de transporte de glicose nas células musculares é controlada, pelo menos em parte, pela quantidade de transportador presente na superfície celular (Chang e col., 2004). Pinent e colaboradores (2004) notaram em seus estudos que o extrato de semente da uva vinífera exerce atividade insulino mimética *in vitro* e aumenta a quantidade de GLUT-4 em linhagens celulares sensíveis à insulina, sugerindo portanto, um mecanismo extra-pancreático para a ação anti-diabética. Nossos dados confirmam e ampliam os dados encontrados por Pinent e colaboradores, pois demonstramos que a redução da glicemia de jejum pelo ACH09 foi acompanhada pelo aumento *in vivo* do conteúdo total do IR e do GLUT-4, e da fosforilação da Akt no músculo esquelético, propondo que a justificativa para os efeitos hipoglicemiantes e anti-hiperglicemiantes do ACH09 possa ser a ativação da sinalização da insulina e a regulação do metabolismo glicídico.

A hipótese anterior é corroborada pela análise do índice de HOMA, uma vez que o aumento da resistência à insulina observado nos animais tratados com aloxânio foi significativamente corrigido pelo tratamento com o ACH09, visto pela diminuição do índice de HOMA nestes animais. Como a diminuição do índice de HOMA e o aumento da sensibilidade à insulina se correlacionam com a elevação do conteúdo de GLUT-4, nós sugerimos que o efeito do extrato de casca de uva na sensibilidade à insulina provavelmente ocorre através do aumento na quantidade total de GLUT-4 observado no músculo esquelético, e conseqüente captação de glicose. O aumento da fosforilação da Akt nos camundongos

diabéticos induzidos por aloxânio tratados com ACH09 indica que o efeito anti-hiperglicêmico do ACH09 pode ser devido não somente ao maior conteúdo de GLUT-4, mas também ao aumento da sensibilidade na cascata de sinalização de insulina. Nossos dados corroboram com os achados de Napoli e colaboradores (2005) em relação a diminuição da resistência à insulina, porém os expandimos, uma vez que conseguimos demonstrar o possível efeito extra-pancreático do extrato da casca de uva, que seria o aumento da sensibilidade à insulina em tecido muscular esquelético.

Como o ACH09 não aumentou a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas *in vitro*, ou os níveis de insulina plasmática *in vivo*, os mecanismos envolvidos no efeito anti-hiperglicêmico do ACH09 não parecem o mesmo das sulfoniluréias, o qual estimula a liberação de insulina pelas células beta pancreáticas. Por outro lado, o mecanismo parece mimetizar a ação de fármacos como as tiazolidionas, que aumentam a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (Cheng & Fantus, 2005).

Em nosso estudo não encontramos mudanças nos níveis de triglicerídeos plasmáticos, assim como estudo realizado em pacientes DM2 que receberam vinho ou suco de uva durante 30 dias e não apresentaram mudanças na trigliceridemia (Bantle e col., 2008). É possível que não tenhamos observado mudanças devido ao tempo de tratamento dos animais diabéticos com o ACH09 ter sido muito curto para modificar este parâmetro.

Em nosso estudo encontramos menores níveis de colesterol total nos animais diabéticos tratados com ACH09, assim como Su e colaboradores (2006), entretanto nenhuma modificação aconteceu nos animais não diabéticos que

também receberam o extrato. A literatura sugere que os polifenóis atuem reduzindo a absorção de colesterol, além de diminuir também sua síntese no fígado (Su e col., 2006), entretanto esses aspectos não foram avaliados no presente estudo.

O mecanismo pelo qual o ACH09 induz ao aumento da sensibilidade à insulina no músculo esquelético ainda não está completamente elucidado. Sugere-se que os compostos fenólicos presentes no vinho tinto reduzem e/ou neutralizam radicais livres e promovem a formação de NO (Marfella e col., 2006). Em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo, observamos que o ACH09 possui efeito anti-hipertensivo, vasodilatador e antioxidante, além de aumentar a produção de NO no endotélio (Soares de Moura e col., 2002; Soares de Moura e col., 2004), e este por sua vez poderia ser um dos possíveis mecanismos sugeridos para o fato de termos encontrado aumento na sinalização da insulina no músculo esquelético dos animais tratados com ACH09, uma vez que já foi demonstrado que a incubação do músculo esquelético com L-NAME, um inibidor da NO sintase, leva a diminuição do transporte de glicose, mostrando a sua importância neste mecanismo (Balon & Nadler, 1997). Mais recentemente, demonstraram que no músculo esquelético, o NO aumenta a expressão do GLUT-4 via mecanismos dependentes de GMP cíclico e AMPK (Lira e col., 2007).

Além disso, enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, que catalisam os radicais livres reduzindo sua quantidade, parecem estimular a utilização de glicose em músculo isolado pós exercício, através de uma ação independente da insulina (Young e col., 1997), e segundo a literatura, os compostos fenólicos são capazes de aumentar os níveis plasmáticos de

antioxidantes. Todavia, mais estudos serão necessários para elucidar os mecanismos pelo qual há o aumento na sinalização da insulina que possivelmente resultou no aumento da sensibilidade à insulina.

6. Conclusão

Nossos resultados indicam que o Extrato da Casca de Uva (ACH09) tem efeito hipoglicêmico e anti-hiperglicêmico nos camundongos. Tais efeitos parecem ser independentes do aumento da liberação de insulina nas células beta pancreáticas. Por outro lado, os dados mostram que o tratamento com ACH09 induz a um aumento no conteúdo do receptor de insulina, da Akt fosforilada e do GLUT-4 no músculo esquelético, e portanto, nós sugerimos que o ACH09 pode atuar reduzindo a resistência à insulina pela ativação da cascata de sinalização de insulina nos tecidos periféricos. Nossos resultados oferecem uma possibilidade pré-clínica de efeito protetor do extrato obtido das uvas em pacientes com DM2.

7. Referências bibliográficas

Aires MM: Fisiologia: Fisiologia Endócrina. Guanabara Koogan, p.842-854, 1999.

Aguiar LG, Villela NR, Bouskela E. A Microcirculação no Diabetes: Implicações nas Complicações Crônicas e Tratamento da Doença. Arq Bras Endocrinol Metab 2007;51/2:204-211.

Al-Awwadi NA, Bornet A, Azay J, Araiz C, Delbosc S, Cristol JP e col. Red wine polyphenols alone or in association with ethanol prevent hypertension, cardiac hypertrophy, and production of reactive oxygen species in the insulin-resistant fructose-fed rat. J Agric Food Chem 2004;8:5593-7.

Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. Diabet Med. 1997;14 (Suppl. 5):S1–S85.

Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. Br J Pharmacol. 1997;120(6):1053-8.

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. Toxicology. 2000;7;148(2-3):187-97.

Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. J Appl Physiol 1997;82:359-63.

Bantle AE, Thomas W, Bantle JP. Metabolic effects of alcohol in the form of wine in persons with type 2 diabetes mellitus. Metabolism. 2008;57:241-5.

Boylan JM, Brautigan DL, Madden J, Raven T, Ellis L, Gruppuso PA. Differential regulation of multiple hepatic protein tyrosine phosphatases in alloxan diabetic rats. *J Clin Invest* 1992;90:174-9.

Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R et al. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: a pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur J Clin Invest* 2001;31:322-8.

Chang L, Chiang SH, Saltiel AR. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* 2004;10:65-71.

Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*. 2005;18;172(2):213-26.

Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Viseu Dos Santos AC, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*. 2001; 20-27;414(6866):863-4.

da Luz PL, Coimbra SR. Wine, alcohol and atherosclerosis: clinical evidences and mechanisms. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(9):1275-95.

de Moura RS, Miranda DZ, Pinto AC, Sicca RF, Souza MA, Rubenich LM, Carvalho LC, Rangel BM, Tano T, Madeira SV, Resende AC. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and the antihypertensive effect of Brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Sep;44(3):302-9.

de Moura RS, Resende AC, Moura AS, Maradei MF. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats.

Hypertens Pregnancy. 2007;26:89-100.

de Vegt F, Dekker JM, Groeneveld WJ, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption is associated with lower risk for incident diabetes and mortality: the Hoorn Study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002;57(1):53-60

Demrow HS, Slane PR, Folts JD. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation.* 1995;15:1182-8.

Doyle ME, Egan JM. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. *Pharmacol Rev.* 2003;55(1):105-31.

El-Alfy AT, Ahmed AA, Fatani AJ. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol Res.* 2005;52(3):264-70.

Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43(1):61-8.

Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Coffey RG. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products. *Am J Physiol* 1993;265:774-8.

Flanagan DE, Moore VM, Godsland IF, Cockington RA, Robinson JS, Phillips DI. Alcohol consumption and insulin resistance in young adults. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(4):297-301.

Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*

1993;20:454-7.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 1989;3(9):2007-18.

Gomes MB. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50/2:271-280.

Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995;41(12):1819-1828.

Gylfe E: Nutrient secretagogues induce bimodal early changes in cytoplasmic calcium of insulin-releasing ob/ob mouse beta-cells. *J Biol Chem* 1988;263:13750-13754.

Hansen AS, Marckmann P, Dragsted LO, Finné Nielsen IL, Nielsen SE, Grønbaek M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr.* 2005;59(3):449-55.

Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993;342(8878):1007-11.

International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*; second edition. 2003.

im Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sci.* 2002;23;71(14):1681-94.

Lira VA, Soltow QA, Long JH, Betters JL, Sellman JE, Criswell DS. Nitric oxide increases GLUT4 expression and regulates AMPK signaling in skeletal muscle. *Am J*

Physiol Endocrinol Metab. 2007;293(4):E1062-8.

Madeira SV, de Castro Resende A, Ognibene DT, de Sousa MA, Soares de Moura R. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. *Pharmacol Res.* 2005;52:321-7.

Malerbi DA, Franco LJ. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. *Diabetes Care.* 1992;15(11):1509-16.

Marfella R, Cacciapuoti F, Siniscalchi M, Sasso FC, Marchese F, Cinone F et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2006;23:974-81.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28:412-9.

Mattivi F, Zulian C, Nicolini G, Valenti L. Wine, biodiversity, technology, and antioxidants. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:37-56.

Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature.* 2001;414(6865):821-7.

Napoli R, Cozzolino D, Guardasole V, Angelini V, Zarra E, Matarazzo M et al. Red wine consumption improves insulin resistance but not endothelial function in type 2 diabetic patients. *Metabolism.* 2005;54:306-13.

Ndiaye M, Chataigneau T, Andriantsitohaina R, Stoclet JC, Schini-Kerth VB. Red wine polyphenols cause endothelium-dependent EDHF-mediated relaxations in porcine coronary arteries via a redox-sensitive mechanism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(2):371-7.

Nettleton JA, Harnack LJ, Scrafford CG, Mink PJ, Barraj LM, Jacobs DR Jr. Dietary flavonoids and flavonoid-rich foods are not associated with risk of type 2 diabetes in postmenopausal women. *J Nutr.* 2006;136:3039-45.

Oliveira JE, Milech A, Franco LJ. The prevalence of diabetes in Rio de Janeiro, Brazil. The Cooperative Group for the Study of Diabetes Prevalence in Rio De Janeiro. *Diabetes Care.* 1996;19(6):663-6.

Pinent M, Blay M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology.* 2004;145:4985-90.

Providência R. Cardiovascular protection from alcoholic drinks: scientific basis of the French Paradox. *Rev Port Cardiol.* 2006;25(11):1043-58.

Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet.* 1992;20:1523-6.

Ryan JM, Revilla E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J Agric Food Chem.* 2003; 21;51(11):3372-8.

Sacanella E, Vázquez-Agell M, Mena MP, Antúnez E, Fernández-Solá J, Nicolás JM, Lamuela-Raventós RM, Ros E, Estruch R. Down-regulation of adhesion molecules and other inflammatory biomarkers after moderate wine consumption in healthy

women: a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1463-9.

Salido FP, Fernández JJR. Influencia de los radicales libres em el envejecimiento celular. *OFFARM.* 2002;21(7): 96-100;

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;13:799-806.

Seigneur M, Bonnet J, Dorian B, Benchimol D, Drouillet D, Gouverneur G, Larrue J, Crockett R, Boiseau M, Gayon R. Effect of consumption of alcohol, white wine and red wine on platelet function and serum lipids. *J Appl cardiol.* 1990; 5:215-22.

Soares de Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP et al. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002;54:1515-20.

St Leger AS, Cochrane AL, Moore F. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet.* 1979;12:1017-20.

Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Arky RA, Hennekens CH et al. A prospective study of moderate alcohol drinking and risk of diabetes in women. *Am J Epidemiol.* 1988;128:549-58.

Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol.* 1997;30(2):325-33.

Stein JH, Keevil JG, Wiebe DA, Aeschlimann S, Folts JD. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in

patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999;100(10):1050-5.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537-46.

Su HC, Hung LM, Chen JK. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(6):E1339-46.

Szmitko PE, Verma S. Cardiology patient pages. Red wine and your heart. *Circulation*. 2005;18:10-1.

Tarasov A, Dusonchet J, Ashcroft F. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel: a pas de deux. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S113-22.

Torquato MT, Montenegro Júnior RM, Viana LA, de Souza RA, Lanna CM, Lucas JC et al. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med J*. 2003;121(6):224-30.

Vijayakumar M, Govindarajan R, Rao GM, Rao ChV, Shirwaikar A, Mehrotra S, Pushpangadan P. Action of *Hygrophila auriculata* against streptozotocin-induced oxidative stress. *J Ethnopharmacol*. 2006;104(3):356-61.

Wallerath T, Poleo D, Li H, Forstermann U. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*. 2003;5:471-8.

Wannamethee SG, Camargo CA Jr, Manson JE, Willett WC, Rimm EB. Alcohol drinking patterns and risk of type 2 diabetes mellitus among younger women. *Arch*

Intern Med. 2003;163:1329-36.

Waterhouse AL. Wine phenolics. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:21-36.

Wei M, Gibbons LW, Mitchell TL, Kampert JB, Blair SN. Alcohol intake and incidence of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care.* 2000;23:18-22.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27(5):1047-53

Yamaoka T, Itakura M: Development of pancreatic islets (review). *Int J Mol Med.* 1999;3:247-261,

Zafrilla P, Morillas J, Mulero J, Cayuela JM, Martínez-Cachá A, Pardo F, López Nicolás JM. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2003;51(16):4694-700.

Young ME, Radda GK, Leighton B. Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J.* 1997;322 (Pt 1):223-8.

Zecchin HG, Carvalheira JBC, Saad MJA. Mecanismos moleculares de resistência à insulina na síndrome metabólica - *Rev Soc Cardiol.* 2004;4:574:89.

Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols. *J Nutr.* 2005;135(10):2291-4.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001;13:782-7.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)