



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

CLEIDE DE SOUSA LINO

**EFEITOS ANTIDIABÉTICO, ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICO E
ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM METANOL E TIRAMINA
ISOLADOS DE *Cissus verticillata***

**FORTALEZA
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CLEIDE DE SOUSA LINO

**EFEITOS ANTIDIABÉTICO, ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICO E
ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM METANOL E TIRAMINA
ISOLADOS DE *Cissus verticilata***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA
2008

L73e

Lino, Cleide de Sousa

Efeitos antidiabético, antioxidante, analgésico e antiinflamatório da fração solúvel em metanol e tiramina isolados de *Cissus verticillata* / Cleide de Sousa Lino; orientadora: Glauce Socorro de Barros Viana. – Fortaleza, 2008.

190f. :il.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2008.

1. Cissus 2. Tiramina 3. Glibureto 4. Metformina 5. Antioxidantes 6. Analgésicos 7. Antiinflamatórios I.Viana, Glauce Socorro (Orient.) II. Título

CDD: 615.323279

CLEIDE DE SOUSA LINO

EFEITOS ANTIDIABÉTICO, ANTIOXIDANTE, ANALGÉSICO E
ANTIINFLAMATÓRIO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM METANOL E TIRAMINA
ISOLADOS DE *Cissus verticilata*]

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profª. Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Prof. Dr. José Henrique Cardoso Leal
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Profª. Dra. Maria Goreti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará - UFC

Dedico,

Á DEUS, fonte de toda a sabedoria.

A Ele toda honra, glória e louvor.

Obrigada pelas bênçãos recebidas.

AOS MEUS PAIS

Pedro e Maria José

Sempre dedicados durante toda minha formação intelectual.

Obrigada pelas orações e apoio incondicional em todos os momentos.

AOS MEUS IRMÃOS

Cléa

Pela força e estímulo durante toda a minha vida.

Clésio

Meu primeiro professor e por ter me ensinado as primeiras letras.

AO MEU ESPOSO

José Orismar

Pela paciência, dedicação e companherismo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glauce S. B. Viana, pela orientação científica, apoio e estímulo na realização deste trabalho;

À Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço pelo incentivo, apoio e colaboração durante todo o estudo;

Ao Prof. Dr. Edilberto Silveira pelos estudos com *C. verticillata* e por ter aceitado colaborar com a parte química do estudo;

Ao Francisco S. O. Alexandre pela colaboração com os estudos químicos de *C. verticillata* e por sua atenção e esforço em nos atender a cada solicitação;

À Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz e seus bolsistas: Renata, Jamile e Daniel pela amizade e colaboração com a parte bioquímica do estudo;

À Profa. Dra. Maria Salete Rocha Cipriano Brito, professora da Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela colaboração na dosagem da hemoglobina glicada e pelas palavras de incentivo;

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, ao técnico de laboratório Ivan e ao bolsista de Iniciação Científica Samuel pela colaboração na preparação das lâminas e análises histopatológicas;

Aos Profs. Drs. José Henrique Cardoso Leal e Pedro Jorge Caldas Magalhães por terem aceitado participar da banca de doutorado;

Aos queridos bolsistas do laboratório envolvidos durante todo o trabalho de tese: Bruno, Daniel, João Paulo e Tiago, pela dedicação e colaboração.

Às técnicas Xênia e Ívina Ângela, do laboratório de biofisiologia da Universidade de Medicina de Juazeiro (FMJ) pela valiosa contribuição nos experimentos do estudo;

À Vilani R. Bastos e Jaqueline Viana pela colaboração no desempenho dos experimentos do estudo.

Aos companheiros do laboratório: Kaline Leal, Silvânia Vasconcelos, Marta Fonteles, Daniele Macedo, Juvênia Fontenele, Flávio Maia, Vera Targino, Lissiana Magna, Patrícia Gomes, Isabel, Ticiane e Jeferson e todos os demais que formam o laboratório de Neurofarmacologia, pela amizade e colaboração em muitos momentos.

À equipe do Biotério de Fisiologia e Farmacologia, pelo auxílio na aquisição dos animais;

Aos colegas do Hospital Infantil Albert Sabin pela compreensão e amizades sempre presentes;

Aos meus queridos irmãos e amigos da Igreja Presbiteriana Independente de Fortaleza pelas orações incessantes por mim;

A todos que direta e indiretamente colaboraram em alguma etapa de minha jornada.

RESUMO

Introdução: A *Cissus verticillata* é uma planta, utilizada popularmente como antidiabética e antiinflamatória, **Objetivos:** Investigar as atividades antidiabética, analgésica, antiinflamatória e antioxidante da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT) e tiramina (TIR) isolados de *Cissus verticillata*. **Material e Métodos:** Ratos Wistar, machos, foram tratados por via oral com a FSM (50 e 100 mg/kg), glibenclamida (GLI, 5 mg/kg), água destilada ou glicose), e o sangue coletado antes e 30, 60, 90 e 120 min após à glicose (3g/kg) para medir a hipoglicemia. Na avaliação da glicemia em ratos normais, os animais foram tratados com a FSM (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg) ou água destilada e a glicemia medida antes e 5 dias depois do tratamento. O diabetes foi induzido com aloxano (40 mg/kg, i.v) e após 48 h, os animais foram tratados por via oral com a FSM (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg) e TIR (2 e 4 mg/kg) e a glicemia determinada antes e 30, 60, 90 e 120 min após à glicose. Outros grupos de animais diabéticos foram tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg), FRT (100 mg/kg), TIR (1- 4 mg/kg), GLI (2,5 e 5 mg/kg), MET (50 e 100 mg/kg) e 5 dias depois, o sangue foi coletado para avaliação da glicemia, triglicerídios, VLDL, colesterol total, HDL, AST, ALT, uréia e creatinina. Os animais que sobreviveram foram sacrificados, dissecados o pâncreas e o fígado, e os órgãos foram usados para a avaliação histopatológica, sendo este último também utilizado para avaliação da atividade antioxidante (TBARS, GSH, catalase e nitritos/nitratos). Para determinação da hemoglobina glicada *in vitro* foi utilizado sangue de ratos não-diabéticos incubados com D-glicose (50mM) e FSM ou TIR (50 µg/ml). Na dosagem do glicogênio hepático, ratos diabéticos foram tratados por 10 dias com a FSM. A avaliação da atividade analgésica foi realizada em camundongos Swiss, machos, tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg, v.o.), TIR (1,2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg) e MOR (10 mg/kg,.) no teste da formalina. A atividade antiinflamatória foi analisada com os modelos do edema de pata induzido por carragenina ou dextrano, em ratos e camundongos tratados com FSM (50 e 100 e 200 mg/kg), TIR (1- 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg), INDO (5 mg/kg) e CIPRO (5 e 10 mg/kg, v.o.). **Resultados:** A FSM demonstrou pequena atividade hipoglicemiante no teste de tolerância a glicose em ratos normais e foi ineficaz em diabéticos. A FSM reduziu a glicemia em ratos normais, enquanto a TIR não teve efeito. O tratamento de ratos diabéticos durante 5 dias com a FSM, FRT, TIR, GLI e MET reduziu a glicemia, triglicerídios, VLDL, uréia e creatinina. Nenhuma potencialização do efeito hipoglicêmico foi observado com a associação de FSM + TIR ou GLI + TIR. Os estudos histopatológicos mostraram regeneração das lesões e aumento do número de células β após tratamento dos animais diabéticos com a FSM, TIR e GLI. A FSM e TIR mostraram atividade antioxidante, como aumento no nível de GSH e redução nos níveis de catalase e nitritos. A FRT aumentou somente o GSH. A FSM e TIR reduziram a hemoglobina glicada, demonstraram potente atividade analgésica, mas foram ineficazes como antiinflamatórias. A FSM e TIR não reverteram a hiperglicemia induzida pelo diazóxido, um bloqueador dos canais de potássio. MET e TIR reduziram a glicemia, triglicerídios, VLDL, uréia e creatinina, e os efeitos hipoglicemiantes foram potencializados quando essas duas drogas foram associadas. **Conclusão:** Estes resultados confirmam a atividade hipoglicemiante da FSM. O mecanismo de ação não parece ser similar aquele apresentado pelas sulfoniluréias. A potencialização do efeito hipoglicemiante da TIR foi observada após sua associação com MET, sugerindo que o mecanismo de ação dos constituintes hipoglicêmicos de *C. verticillata* é similar ao das biguanidas. Posteriormente, a FSM e TIR apresentaram atividade antioxidante, reduzidos níveis de hemoglobina glicada, aumento do glicogênio hepático, e no número de células β pancreáticas, sugerindo que essas drogas diminuem a toxicidade hepática e pancreática. Embora a atividade antiinflamatória

tenha sido marginal, seu efeito foi potencializado pela associação com TIR, indicando que a TIR é um dos principais constituintes bioativos de *Cissus verticillata*.

Palavras-chave: *Cissus verticillata*. Fração Solúvel em Metanol. Fração Rica em Tiramina. Tiramina. Glibenclamida. Metformina. Atividade Hipoglicemiante Antioxidante Analgésica e Antiinflamatória.

ABSTRACT

Introduction: *Cissus verticillata* is a medicinal plant used as an antidiabetic and anti-inflammatory. **Objectives:** To investigate the antidiabetic, analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of the methanol soluble fraction (MSF), tyramine rich fraction (TRF), and Tyramine (TYR) from *C. verticillata* leaves. **Material and Methods:** Male Wistar rats were treated orally with the MSF (50 and 100 mg/kg), glibenclamide (GLI, 5 mg/kg), distilled water or glucose, and blood collected before and 30, 60, 90 and 120 min after glucose (3 g/kg) for measuring hypoglycemia. To evaluate glycemia in normal rats, animals were treated with the MSF (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), or distilled water and glycemia measured before and 5 days after treatments. Diabetes was induced by alloxan (40 mg/kg, i.v.) and, after 48 h, animals were treated with the MSF (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), TYR (2 and 4 mg/kg), and glycemia determined before and 30, 60, 90 e 120 min after glucose. Another group of diabetic animals was treated with the MSF (50 e 100 mg/kg), TRF (100 mg/kg), TYR (1- 4 mg/kg), GLI (2 - 5 mg/kg), or metformin (MET, 50 and 100 mg/kg) and, 5 days later, blood was collected for the evaluation of glycemia, triglycerides, VLDL, total cholesterol, HDL, AST, ALT, urea and creatinine. Survivals were sacrificed, pancreas and liver dissected, and organs used for histological studies and evaluation of antioxidant activity (TBARS, GSH, catalase, and nitrites). For the glycated hemoglobin determination *in vitro*, blood of the non-diabetic rats was incubated with the D-glucose (50mM) and MSF or TYR (50 µg/ml) and for liver glycogen measurements, diabetic rats were treated for 10 days with the MSF. The analgesic activity was assessed in male Swiss mice treated with the MSF (50 e 100 mg/kg), TYR (1, 2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg), and MOR (10 mg/kg) by the formalin test. Anti-inflammatory activity was assessed with the models of paw edema induced by carrageenan or dextran, in rats and mice treated with the MSF (50, 100 and 200 mg/kg), TYR (1 - 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg), INDO (5 mg/kg) and CIPRO (5 and 10 mg/kg). **Results:** The MSF showed a slight hypoglycemic activity in the glucose tolerance test in normal rats, and was devoid of effect in diabetic rats. The MSF reduced glycemia in normal controls, while TYR showed no effect. The treatment of diabetic rats for 5 days with the MSF, TRF, TYR, GLI and MET reduced glycemia, triglycerides, VLDL, urea and creatinine. No potentiation of the hypoglycemic effect was observed after the association of MSF + TYR or GLI + TYR. Histological studies showed a regeneration of lesions and increase in number of pancreatic beta cells, after treatment of diabetic animals with the MSF, TYR and GLI. The MSF and TYR showed antioxidant activities, as demonstrated by improvements of GSH and reduction in the catalase and nitrite values. The TRF increased only GSH activity. The MSF and TYR decreased glycated hemoglobin, showed potent analgesic activities and no significant anti-inflammatory activity. MSF and TYR did not reverse hyperglycemia induced by diazoxide, a K channel blocker. MET and TYR reduced glycemia, triglycerides, VLDL, urea and creatinine, and the hypoglycemic effects were potentiated when these two drugs were associated. **Conclusion:** These studies confirm the hypoglycemic activity of the MSF. The mechanism of action does not seem to be similar to that presented by sulfonylureas. A potentiation of the hypoglycemic effect of TYR was observed after its association with MET suggesting that the mechanism of action of the hypoglycemic constituents from *C. verticillata* is similar to that of biguanides. Furthermore, the MSF and TYR showed an antioxidant activity, reduced glycated hemoglobin levels, increased hepatic glycogen and number of pancreatic beta cells, suggesting that these drugs decrease pancreatic and hepatic toxicities. Although the anti-inflammatory activity of the MSF was marginal, its effect was

potentiated by the association with TYR, indicating that TYR is one of the main bioactive constituents of *C. verticillata*.

Keywords: *Cissus verticillata*. Methanol Soluble Fraction. Tyramine Rich Fraction. Tyramine. Glibenclamide. Metformin. Hypoglycemic Antioxidant Analgesic and Anti-inflammatory Activities.

LISTA DE FIGURAS

1	Detalhe dos ramos com flores de <i>Cissus verticillata</i>	31
2	Detalhe dos ramos com frutos jovens de <i>Cissus verticillata</i>	31
3	Detalhe dos frutos jovens de <i>Cissus verticillata</i>	31
4	Detalhe dos frutos maduros de <i>Cissus verticillata</i>	32
5	<i>Cissus verticillata</i> com aspecto que justifica o nome popular “cortina de pobre”	32
6	Estrutura do 4- (2- aminoetilfenol). Nome usual: Tiramina	39
7	Pró-insulina humana e sua conversão em insulina	51
8	Mecanismo de ação da insulina	53
9	Avaliação da Glicemia de ratos normoglicêmicos antes e depois do tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI)	82
10	Curva glicêmica com Aloxano (ALX)	83
11A e 11B	Avaliação da glicemia de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 11 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 11(B)	88
12	Avaliação da glicemia de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)	89
13A e 13B	Avaliação dos triglicerídios de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 13 (A) ou Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 13 (B)	93
14	Avaliação dos triglicerídios em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)	94

15A e 15B	Avaliação do VLDL em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI), figura 15 (A) ou Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 15 (B)	95
16	Avaliação do VLDL em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) ou com as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)	96
17A e 17B	Avaliação do colesterol em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 17 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 17 (B)	97
18	Avaliação do colesterol em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)	98
19A e 19B	Avaliação do HDL em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), e Glibenclamida (GLI), figura 19 (A) ou com a FRT e TIR, figura 19 (B)	99
20	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a peroxidação lipídica determinada pelos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos diabéticos	107
21	Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a peroxidação lipídica determinada pelos níveis de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em fígado de ratos diabéticos	108
22	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a redução no nível de glutathiona (GSH) em fígado de ratos diabéticos.....	109
23	Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a redução no nível de glutathiona (GSH) em fígado de ratos diabéticos	110
24	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos diabéticos.....	111

25	Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT),Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos diabéticos.....	112
26	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a redução no nível de nitritos em fígado de ratos diabéticos	113
27	Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT),Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a redução no nível de nitritos em fígado de ratos diabéticos	114
28	Micrografia ilustrando os efeitos da Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI) em pâncreas de ratos diabéticos	117
29	Micrografia ilustrando os efeitos da Tiramina (TIR) em pâncreas de ratos diabéticos	118
30	Contagem de ilhotas em pâncreas de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI)	119
31	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre o glicogênio hepático de ratos diabéticos	120
32	Atividade analgésica da Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI) no Teste da Formalina em camundongos	135
33	Atividade analgésica da Tiramina (TIR) e Morfina (MOR) no Teste da Formalina em camundongos	136
34	Atividade analgésica da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e a associação (FSM + TIR) no Teste da Formalina em camundongos	137

LISTA DE TABELAS

1	Produtos naturais hipoglicemiantes	28
2	Classificação etiológica do diabetes <i>mellitus</i> (DM)	40
3	Valores de glicose plasmática em jejum par o diagnóstico de diabetes mellitus e seus estágios pré-clínicos	42
4	Identificação clínica da síndrome metabólica	44
5	Tratamento do DM2 com agentes antidiabéticos	61
6	Teste de tolerância a glicose em ratos normoglicêmicos	81
7	Avaliação de peso e mortalidade em ratos induzidos com aloxano	84
8	Teste de tolerância a glicose em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI).....	85
9	Teste de tolerância a glicose em ratos diabéticos tratados com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR).....	86
10	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR) sobre os níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos	103
11	Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR) sobre os níveis séricos das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) em ratos diabéticos	104
12	Glicação in vitro da hemoglobina (4 g/dL) de ratos não diabéticos, na presença de D-glicose 50 mM e a Fração Solúvel em Metanol (FSM) comparada com a Tiramina (TIR) e Quercetina (QCT)	116
13	Avaliação da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) na curva glicêmica com diazóxido em ratos.....	122
14	Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre a glicemia de ratos diabéticos	124
15	Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre o colesterol total de ratos diabéticos	125

16	Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os triglicerídios e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) de ratos diabéticos	126
17	Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os níveis séricos uréia e creatinina em ratos diabéticos	128
18	Efeito da Tiramina (TIR), Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os níveis séricos das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) de ratos diabéticos.....	130
19	Avaliação de peso e mortalidade de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT),Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR; GLI + TIR; MET + TIR)	133
20	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina em camundongos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e Indometacina (INDO).....	139
21	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina em ratos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM)	140
22	Avaliação do edema de pata induzido por carragenina em ratos após tratamento com a Tiramina (TIR) e Indometacina (INDO).....	141
23	Avaliação do edema de pata induzido por dextrano em camundongos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e Ciproheptadina (CIPRO).....	142
24	Avaliação do edema de pata induzido por dextrano em ratos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Ciproheptadina (CIPRO)	143

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Gama
μL	Microlitro
ADA	American diabetes association
AGES	Produtos avançados de glicação
AHA	American heart association
ALT	Alanina transaminase
ALX	Aloxano
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato transaminase
ATP	Trifosfato de adenosina
BB	Biobreding
Ca	Cálcio
CCD	Cromatografia de camada delgada
CD	Controle diabético
CH	Controle hiperglicêmico
CIPRO	Ciproheptadina
CN	Controle normal
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Colesterol total
DCCT	Diabetes control and complication trial
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP-IV	Dipeptidil peptidase
DTNB	5,5'- dithiobis (2- nitrobenzoic acid)
DZ	Diazóxido
EDTA	Etilenodiaminotetracético

EROS	Espécies reativas de oxigênio
EPM	Erro padrão da media
EUA	Estados Unidos da América
FIM	Fração insolúvel em metanol
FSM	Fração solúvel em metanol
FRT	Fração rica em tiramina
GIP	Polipeptídio insulínico dependente de glicose
GK	Goto kakisaki
GLI	Glibenclamida
GLP- 1	Peptídio semelhante ao glucagon
GOD	Glicose oxidase
GSH	Glutathiona reduzida
Hb	Hemoglobina
HbA1c	Hemoglobina glicada
HCL	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
5- HT	5- hidroxitriptamina
INDO	Indometacina
KCL	Cloreto de potássio
L- DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina ou levodopa
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malonildialdeído
MDH	Malato desidrogenase
MET	Metformina
MOR	Morfina
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Nicotinamida adenina de nucleotídio
NADPH	Nicotinamida adenina de nucleotídio – p reduzido
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NANO ₂	Nitrato de sódio
NAOH	Hidróxido de sódio

NCEP-ATPIII	National cholesterol education program adult treatment panel III
NMDA	N- metil- D- aspartato
NOD	Non obese
NPH	Neutral protamine hagedron
NPL	Neutral protamine lispro
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PCR	Proteína C-reativa
QCT	Quercetina
RMN	Ressonância magnética nuclear
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SM	Síndrome metabólica
TBARS	Espécies reativas do ácido tiobarbitúrico
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose
TG	Triglicerídio
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica
TIR	Tiramina
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UKPDS	UK Prospective diabetes study group
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Plantas com atividade antidiabética	23
1.2	<i>Cissus verticillata</i>	29
1.2.1	Descrição botânica, distribuição geográfica e etnofarmacológica.....	29
1.2.2	Farmacologia pré-clínica e constituintes químicos.....	33
1.3	Tiramina	35
1.4	Diabetes mellitus (DM)	39
1.4.1	Conceito e classificação.....	39
1.4.2	Resistência a insulina e síndrome metabólica.....	42
1.4.3	Prevalência do DM no mundo e no Brasil.....	44
1.5	Modelos experimentais de DM	46
1.6	Tratamento do DM	50
1.6.1	Insulina.....	50
1.6.2	Hipoglicemiantes orais.....	58
1.7	Justificativa e objetivos	62
1.7.1	Justificativa	62
1.7.2	Objetivo geral	63
1.7.3	Objetivos específicos	64
2	MATERIAL E MÉTODOS	65
2.1	Material	65
2.1.1	Material botânico.....	65
2.1.2	Fração solúvel em metanol (FSM) e Fração rica em tiramina (FRT) de <i>C. verticillata</i>	65
2.1.3	Tiramina comercial (TIR)	65
2.1.4	Animais	65
2.1.5	Drogas	66
2.2	Métodos	66
2.2.1	Obtenção da FSM	66
2.2.2	Obtenção da FRT	67

2.2.3	Atividade hipoglicemiante no teste de tolerância à glicose (TTOG) em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM e glibenclamida (GLI)	68
2.2.4	Atividade hipoglicemiante em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM e TIR e GLI	68
2.2.5	Avaliação de peso e mortalidade em ratos induzidos com aloxano (ALX)	68
2.2.6	Curva glicêmica com ALX	69
2.2.7	Atividade hipoglicemiante no TTOG em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI	69
2.2.8	Avaliação da glicemia, triglicerídios, lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), colesterol total, e lipoproteína de alta densidade (HDL), uréia, creatinina, aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR, GLI e Metformina (MET).....	69
2.2.9	Estudo da atividade antioxidante da FSM, FRT, TIR e GLI.....	73
2.2.9.1	Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático – Dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	73
2.2.9.2	Dosagem de Glutathione Reduzida (GSH) – determinação de grupos sulfidrílicos (-SH) não-proteicos.....	73
2.2.9.3	Determinação da atividade da catalase	74
2.2.9.4	Determinação do conteúdo de nitrito/nitrato	74
2.2.9.5	Dosagem de proteína	75
2.2.10	Estudo histopatológico	75
2.2.11	Atividade hipoglicemiante da FSM, TIR e GLI na hiperglicemia induzida por DZ	75
2.2.12	Determinação do conteúdo de glicogênio hepático em ratos diabéticos tratados com a FSM	76
2.2.13	Avaliação da glicação da hemoglobina in vitro em ratos não diabéticos tratados com a FSM, TIR e Quercetina (QCT)	76
2.2.14	Atividade analgésica da FSM, TIR e GLI no teste da formalina em camundongos.....	77
2.2.15	Edema de pata induzido por carragenina em camundongos e ratos.....	78
2.2.16	Edema de pata induzido por dextrano em camundongos e ratos.....	78
2.2.17	Análise estatística.....	79
3	RESULTADOS	80

3.1	Avaliação da atividade hipoglicemiante da FSM e GLI no TTOG em ratos.....	80
3.2	Avaliação da glicemia em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM, TIR e GLI	80
3.3	Avaliação de peso e mortalidade em ratos induzidos com ALX	82
3.4	Curva glicêmica com ALX	83
3.5	Avaliação atividade hipoglicemiante no TTOG em ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR e GLI	84
3.6	Avaliação da atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM +TIR e GLI +TIR)	87
3.7	Avaliação dos triglicerídios e VLDL em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM +TIR e GLI +TIR)	90
3.8	Avaliação dos colesterol total e HDL em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM + TIR e GLI +TIR)	91
3.9	Avaliação dos níveis de uréia e creatinina de ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM +TIR e GLI +TIR) ...	100
3.10	Avaliação dos níveis de AST e ALT de ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM +TIR e GLI +TIR)	101
3.11	Avaliação da atividade antioxidante da FSM, FRT, TIR e GLI em ratos diabéticos	105
3.11.1	Determinação do efeito da FSM, FRT,TIR e GLI sobre a peroxidação lipídica	105
3.11.2	Determinação do efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre o nível de glutathione reduzida	105
3.11.3	Determinação do efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre a atividade da catalase.....	106
3.11.4	Determinação do efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre os níveis de nitrito/nitrato	106
3.12	Dosagem de hemoglobina glicada em ratos não diabéticos tratados com FSM, TIR e QCT	115
3.13	Avaliação Histopatológica em pâncreas de ratos diabéticos por aloxano (ALX) e tratados com a FSM, TIR e GLI	115

3.14	Determinação do conteúdo de glicogênio hepático em ratos diabéticos tratados com a FSM.....	116
3.15	Avaliação da FSM, TIR e GLI na hiperglicemia induzida por DZ.....	121
3.16	Avaliação da glicemia, colesterol total, triglicerídios e VLDL em ratos diabéticos tratados com TIR e MET e sua associação (MET + TIR).....	123
3.17	Avaliação dos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos tratados a TIR e MET e sua associação (MET + TIR).....	127
3.18	Avaliação dos níveis séricos das enzimas AST e ALT em ratos diabéticos tratados com TIR e MET e sua associação (MET + TIR).....	129
3.19	Avaliação final de peso e mortalidade em ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR, GLI e MET	131
3.20	Avaliação da atividade analgésica da FSM, TIR e GLI e da associação (FSM + TIR) no teste da formalina em camundongos.....	134
3.21	Avaliação da atividade antiedematogênica da FSM, TIR e GLI no edema de pata induzido por carragenina e dextrano em camundongos e ratos.....	138
4	DISCUSSÃO	144
5	CONCLUSÕES	161
	REFERÊNCIAS	163

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas com atividade antidiabética

As plantas sempre foram usadas como fonte de medicamentos, sendo que 25 % do total dos fármacos disponíveis atualmente no mercado são originários das mesmas (CALIXTO, 2000). Dados etnobotânicos relatam que cerca de 800 plantas consideradas antidiabéticas confirmaram resultados positivos em ensaios experimentais (GROVER; YADAV; VATS, 2002).

Mais de 1200 espécies de plantas têm sido empregadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar os sintomas do diabetes *mellitus*. Estas representam mais de 725 gêneros em 183 famílias, que se estendem filogeneticamente desde as algas marinhas e fungos até as plantas superiores. Estas famílias englobam plantas largamente distribuídas geograficamente, com grandes distâncias filogenéticas, sugerindo a possibilidade de estudos tradicionais ou experimentais coincidentes e uma enorme variedade de princípios ativos (**Tabela 1**) (IVORRA; PAYÁ; VILLAR, 1989; MARLES; FARNSWORTH, 1995).

A maioria das plantas utilizadas com potencial antidiabético quando avaliadas farmacologicamente demonstraram ter atividade hipoglicemiante e possuir constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes. Todavia, em estudos posteriores revelaram uma grande diversidade de mecanismos de ação que podem levar ao efeito hipoglicemiante, nem todos terapeuticamente úteis (MALES; FARNSWORTH, 1995; HUO; WINTERS; YAO, 2003; SAID *et al.*, 2002).

Algumas plantas antidiabéticas têm efeitos tóxicos os quais podem resultar em hipoglicemia, tais como hepatotoxicidade e bloqueio β -adrenérgico. Alguns detalhes devem ser incorporados a farmacopéia tradicional tais como: identificação da planta, padronização química e biológica do extrato, estabilidade do extrato, dosagens terapêuticas, efeitos colaterais, interações medicamentosas e alimentares e contra-indicações (MARLES; FARNSWORTH, 1995; HUO; WINTERS; YAO, 2003; SAID *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004).

No Brasil existe um grande número de plantas utilizadas popularmente para o tratamento do diabetes *mellitus* dentre elas o alho (*Allium sativum* L.), quixaba (*Bumelia sartorum* Mart.), Melão de São Caetano (*Momordica charantia* L.), Babosa (*Aloe sp*), boa noite (*Catharanthus roseus* (L) G. Don), carqueja (*Baccaris genisteloides* var. *trimer*),

cebola (*Allium cepa* L.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill), graviola (*Annona muricata* L.), insulina vegetal (*Cissus verticillata*), pata de vaca (*Bauhinia forficata* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus sp.*), quixaba (*Bumelia sartorum* Mart.), Roma (*Punica granatum* L. e sucupira (*Bowdichia virgiloides* Kunth) (CARVALHO; DINIZ; MUKHERJEE, 2005; NEGRI, 2005; BNOUHAM *et al.*, 2006).

Plantas comestíveis como *Allium cepa* L (Liliaceae) (cebola) e *Allium sativum* L. (Liliaceae) (alho) possuem baixa concentração de carboidratos e gordura, além de impedir as complicações cardiovasculares diabéticas (BALUCHENEJADMOJARAD; ROGHANI; HOMAYOUNFAR, 2003). Popularmente o alho é utilizado para tratar doenças cardiovasculares, como antitrombótico, antidiabético, antimicrobiano, antitumoral e hipolipêmico (SEMGUPTA.; GHOSH; BHATTACHARRJEE, 2004). Estudos em ratos diabéticos mostraram que estas plantas exercem efeitos antioxidantes e antihiperlipidêmicos e consequentemente aliviam o dano renal e hepático causado pelo aloxano (EL-DEMERDASH; YOUSEF; EL-NAGA, 2005).

Aloe Vera, *A. barbadense*, conhecida popularmente no nordeste do Brasil como babosa possui um sumo utilizado com diversas indicações populares. Estudo com o extrato alcoólico (200 e 300 mg/kg,v.o.) em ratos com sobrecarga de glicose e hiperlipidêmicos por estreptozotocina mostrou que o mesmo é capaz de normalizar a glicemia através do controle das enzimas que metabolizam os carboidratos (RAJASEKARAN *et al.*, 2004). Extratos da planta aumentaram a tolerância a glicose, tanto em ratos normais, como diabéticos, enquanto o uso crônico das folhas de *Aloe barbadensis* Miller (500 mg/kg,v.o) provocou hipoglicemia em camundongos diabéticos aloxonizados (GROVER; VATS, 2001). O gel obtido da folha apresentou atividade hiperlipidemiante, portanto o extrato da folha sem o gel pode ser útil no tratamento do diabetes melito (OKYAR *et al.*, 2001).

Chatharanthus roseus (L.) G. Don, é uma planta utilizada como antidiabético, principalmente na forma de chás (NAMMI *et al.*, 2003). É conhecida popularmente como boa noite e foi comercializada na Inglaterra para o tratamento do diabetes com o nome de “vinculin” (MARLES; FRANSWORTH, 1995). Alguns alcalóides isolados da planta boa noite foram: leurosina, vindolina e vindolinina e catharanthina e tetrahydroalstonina exibiram efeito antidiabético e antiinflamatório (PEARCE, 1990; MARLES; FRANSWORTH, 1995). Porém, em acompanhamento clínico de pacientes em uso da planta observou-se efeito citotóxico e/ou neurotóxico, além de leucopenias e aumento do risco de infecções (BRAGANÇA, 1996).

Estudos realizados por NAMMI *et al.* (2003), com o suco das folhas frescas da planta em ratos normais e diabéticos mostraram que o extrato nas doses de 0.5, 0.75 e 1 ml/kg produziu uma redução dose-dependente da glicemia em ambos os grupos comparáveis com a glibenclamida. Este estudo concluiu que o provável mecanismo de ação seja pelo aumento da secreção de insulina pela célula β ou por um mecanismo extrapancreático e confirmou o uso popular da boa noite como antidiabético.

O uso popular da *Baccharis genisteloides* var. *trimeria* (carqueja), planta nativa do Brasil, é difundido tradicionalmente nos distúrbios digestivos como náusea, má digestão e diarreia (LOW; TONY; BERESFORD, 1994). Ela é rica em óleos essenciais, contendo acetato de carqueja, saponinas, chondilasterol, quercetina e kaempferol (BRAGANÇA, 1996).

Estudos com o uso da planta em pessoas diabéticas e não diabéticas mostrou que a administração do decocto da planta inteira, exceto a raiz, numa concentração de 5 %, na dose de 20 ml, não causou alterações significativas na glicemia e insulinemia em ambos os grupos após 60 e 120 minutos da administração. Porém houve uma diminuição da glicemia em 12 dos 13 diabéticos (BRAGANÇA, 1996).

O *Eucalyptus globulus* Labill (Myrtaceae) também conhecida como eucalipto ou árvore da febre, tem suas folhas bastante utilizadas por sua ação balsâmica e anti-séptica. Possui como princípios ativos, o eucaliptol, pineno, canfeno e fenmeno, além de substâncias aldeídicas, taninos e resinas (BRAGANÇA, 1996). O Extrato aquoso das folhas secas de eucalipto exerceu atividade antidiabética em camundongos com diabetes induzido por estreptozotocina (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Estudos realizados pela universidade Federal do Ceará em 1974 com 15 espécies de plantas utilizadas para diabetes, a *Annona Muricata* (graviola) mostrou que tem atividade hipoglicemiante mais potente do que a clorpropamida. Ness estudo, não foi encontrada atividade hipoglicemiante para o abacate (*Persea gratissima* Gaertn), jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.) e goiabeira *Psidium guajava* L.) (BRAGANÇA, 1996). Estudos mais recentes mostraram que o extrato aquoso de *Annona squamosa* Linn (Annonaceae) reduz a glicemia quando dada para animais diabéticos por estreptozotocina por 12 dias na água de beber (SHIRWAIKAR; RAJENDRAN; DINESH, 2004).

O *Anacardium occidentale* conhecido popularmente como caju, parece ter sido uma das primeiras espécies a ser estudada cientificamente. Existem diversos trabalhos com a

planta mas a primeira confirmação experimental do efeito hipoglicemiante é atribuída a ARDUÍNO; SOARES, 1951). Em humanos, o extrato aquoso de *Anacardium occidentale* quando dado por via oral mostrou efeitos hipoglicêmicos 15-20 min após a ingestão e o efeito máximo foi observado 60-90 min após a ingestão (BRAGANÇA, 1996).

As sementes das frutas de *Syzygium cumini* (syn. *Eugenia jambolona*) tem sido usada na medicina indiana como remédio para tratar o *diabetes mellitus* (BAILEY; DAY, 1989). É vulgarmente conhecida no Brasil como jambolão, podendo ser encontrada em diverso estados do Brasil, incluindo MG, RJ, RS e SP (BRAGANÇA, 1996). A casca, o fruto, a semente e a folha dessa planta são freqüentemente usados no tratamento do diabetes *mellitus* e administrados na forma de diferentes preparados como extrato aquoso ou decocção, extrato etanólico ou suco da planta crua (PEPATO *et al.*, 2001). Estudos controversos mostraram que o extrato da casca *S. cumini* não possui efeito sobre a hiperglicemia e não é eficiente no controle do estresse oxidativo ocasionado pelo estado diabético em ratos (MAZZANTI *et al.*, 2003; SRIDHAR *et al.*, 2005).

Extratos dos frutos, folhas e raízes de *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) são eficazes no tratamento do diabetes tipo II (MIURA *et al.*, 2004; SENANAYAKE *et al.*, 2004). Esta planta, conhecida popularmente como melão de São Caetano, é uma das plantas mais estudadas para o tratamento do diabetes *mellitus* (MARLES; FARNSWORTH, 1995; BRAGANÇA, 1996).

Num estudo randomizado em pacientes diabéticos tratados com 2 cápsulas de *Momordica charantia* ingeridas três vezes ao dia por 3 meses, os resultados mostraram que não houve alteração significativa na glicose sanguínea em jejum, colesterol total, e peso ou creatinina e níveis de transaminases hepáticas (alanino aminotransferase/ALT e aspartato aminotransferase/AST. Houve uma redução de somente 11 % na hemoglobina glicosilada, fazendo com que os autores não tenham uma conclusão definitiva sobre a efetividade da planta no tratamento do diabetes tipo II, necessitando de estudos posteriores (DANSA *et al.*, 2007).

A *Phyllanthus sp* (quebra-pedra) é uma planta conhecida popularmente no tratamento de cálculo renal e como diurética. Estudos clínicos desenvolvidos com a administração oral da planta inteira reduziram a glicemia em diabéticos, como também em não diabéticos, com significativa redução da pressão sistólica (GROVER; VATS, 2001). Um estudo com o extrato metanólico (200 e 1000 mg/kg,v.o.) mostrou redução na glicemia em

ratos com diabetes induzida por aloxano. A administração continuada por 15 dias promoveu uma redução significativa na glicemia sanguínea (RAPHAEL; SABU; KUTTAN, 2002).

O extrato etanólico da casca da raiz de *Bumelia sartorum* Mart (quixaba) mostrou um efeito antidiabético em ratos normais e diabéticos induzidos por aloxano (ALMEIDA; MEDEIRO FILHO; NAIK, 1985). A quixaba, quixabeira, rompejibão é usada popularmente como antidiabética e antiinflamatória. Um triterpeno insaturado foi isolado do extrato etanólico das raízes desta planta, o ácido bássico que mostrou um significativo efeito antidiabético em ratos aloxonizados, além de alterar a tolerância a glicose nestes animais. O tratamento com este ácido promoveu um aumento nos níveis de insulina sanguíneos nos ratos aloxonizados (NAIK; BARBOSA-FILHO; DHULEY, 1991).

A *Punica granatum* L. conhecida popularmente como romã, é um arbusto ou uma pequena árvore nativa do Irã e Afeganistão. É uma planta aclimatada por todo o Brasil. O extrato das raízes e do caule promoveu uma diminuição da glicemia em animais (JAFRI *et al.*, 2000). Em estudos pré-clínicos, a romã inibiu a absorção intestinal de glicose. O extrato hidroalcoólico do epicarpo da romã causou hipoglicemia dose-dependente, com o efeito máximo em cerca de 4-6 horas após a administração intraperitoneal do extrato (NOGUEIRA; PEREIRA, 1986).

A sucupira é também conhecida como sucupira-açu, cutiuba, sucupira branca e cutiubeira. Seu nome científico é *Bowdichia virgiloides* Kunth, seu tubérculo e as cascas apresentam propriedades depurativas (LOW; TONY; BERESFORD, 1994). A casca do caule é utilizada no diabetes mellitus.. Em ensaio com o extrato hidroalcoólico (50 mg/kg, v.o.) em ratos adultos normais observouse uma diminuição de cerca de 33,5 % da glicemia (BRAGANÇA, 1996).

Bauhinia forficata é a espécie de *Bauhinia* mais usada como erva antidiabética no Brasil ,onde é conhecida como pata de vaca. Estudos mostraram significantes reduções na glicemia e triglicerídios de ratos diabéticos tratados como os extratos aquosos, etanólicos e hexânicos (LINO *et al.*, 2004). De modo semelhante, estudos demonstraram que o extrato aquoso de *Bauhinia unguolata* tem atividade hipoglicemiante, hipolipemiante, hipotrigliceridemiante e hipocolesterolemiante (MENDONÇA, 2004).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas baixam a taxa de glicose do sangue pode ser atribuído aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina através da estimulação das células β -pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a taxa de

glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídios; correção da desordem metabólica causada em lipídios e proteínas e estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo (MARLES; FARNSWORTH, 1995; HUO; WINTERS; YAO, 2003; SAID *et al.*, 2002, LI *et al.*, 2004; VOLPATO *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Produtos naturais hipoglicemiantes

Classe Química	Número de constituintes ativos
Alcalóides	38
Carboidratos	66
Cumarinas	04
Glicosídeos cianogênicos	01
Flavonóides	07
Glicopeptídios	20
Sais inorgânicos	03
Iridóides	04
Lipídios	06
Peptídios e aminas	15
Fenólicos	04
Fenolpropanóides	01
Esteróides	07
Estilbenos	01
Substâncias sulfídricas	02
Terpenóides	17
Vitaminas	02
Xantonas	01

Fonte: Marles e Farnsworth (1995)

1.2 *Cissus verticillata*

1.2.1 Descrição botânica, distribuição geográfica e etnofarmacologia

O gênero *Cissus* L. o mais vasto da família Vitaceae, é constituído de 350 a 400 espécies de trepadeiras, com uma distribuição pantropical (CORREA, 1984). No Brasil a família Vitaceae é representada apenas pelo gênero *Cissus*, com 42 espécies descritas para o país. Apesar da maioria crescerem em matas, o gênero está presente também em campos, cerrados e restingas (LOMBARDI, 2000a,b).

Após a conclusão de revisão dos gêneros neotropicais, e enquanto realizando estudo de levantamento florístico em áreas do Nordeste de Minas Gerais e Sudeste da Bahia nos vales dos Rios Jequitinhonha e Mucuri, foi descoberta uma nova espécie de *Cissus*. O novo táxon pertence ao grupo de espécies com folhas simples e tricomas não ramificados não glandulares, incluindo no Brasil extra-amazônico: *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C.E.Jarvis, *C. campestris* (Baker) Planch., *Cissus tinctoria* Mart. E *Cissus paucinervia* Lombardi. As amostras do único espécime conhecido da nova espécie foram empregadas para a elaboração de descrição, ilustração e uma chave de identificação para sua distinção das espécies próximas (LOMBARDI, 2000b,c,d)

Cissus verticillata (L.) pertence a família Vitaceae, sendo conhecida popularmente como anil-trepador, cipó-pucá, cipó-puci, puçá, insulina, insulina vegetal, uva-brava, cortina-japonesa, tinta-dos-gentios cortina-de-pobre (**Figuras 1,2,3,4 e 5**). Apresenta a seguinte sinonímia: *Cissus sicyoides* L., *Cissus canescens* Lam, *Cissus compressicaulis* Ruiz & Pav., *Cissus ovata* Lam., *Cissus smilacina* Kunth, *Cissus tamoides* Cambess., *Cissus umbrosa* Kunth, *Phoradendron verticillatum* (L.) Ducke, *Spondylantha aphylla* C. Presl, *Viscum verticillatum* L., *Vitis sicyoides* (L.) Baker (ALBUQUERQUE, 1989; BARBOSA *et al.*, 2002; PEPATO *et al.*, 2003).

Ainda de acordo com Braga (1985), *Cissus verticillata* pode ser descrita como: “Herbácea escandente ou trepadeira, perene, vigorosa, com ramos e folhas um tanto carnosas, com gavinhas opostas às folhas e raízes aéreas pêndulas, nativa da região norte do Brasil. Folhas simples, membranáceas, glabras, de 4-7 cm de comprimento. Flores pequenas, de cor creme, dispostas em inflorescências corimbiformes (**Figuras 1 e 2**). Fruto drupa ovóide-globosa, de cor roxo-escura, com polpa carnosa, contendo uma única semente de

cerca de 6 mm de comprimento. Multiplica-se tanto por sementes como pelo enraizamento dos ramos” (Figuras 4 e 5)

Cissus verticillata é uma planta amplamente cultivada em jardins e hortas domésticas com fins ornamentais e, principalmente, como cerca-viva destinada a esconder alguma área. Quando plantada em caramanchões suas raízes adventícias pendentes da planta até o chão formam uma ampla cortina, daí a razão do nome popular “cortina de pobre” (Figura 5).

A literatura etnofarmacológica mais antiga cita o uso do chá de suas folhas, na medicina caseira de muitas regiões do país, para o tratamento caseiro de problemas cardíacos principalmente incluindo taquicardia e pressão alta, bem como para hidropsia, anemia, acidente vascular cerebral, tremores e como ativador da circulação sanguínea (ALBUQUERQUE, 1989; MORS; RIZZINE; PEREIRA, 2000; VAN DEN BERG, 1993; VIEIRA, 1992; BARBOSA *et al.*, 2002). O suco das folhas e ramos é empregado em algumas regiões da Amazônia contra epilepsia (MORS; RIZZINE; PEREIRA, 2000). O chá das partes aéreas é utilizado como antiinflamatório, antiepilético, antihipertensivo, antitérmico, anti-reumático e antidiabético (GARCIA *et al.*, 2000; BELTRAME *et al.*, 2001). Em Lavras, estado de Minas Gerais, tem-se mencionado o seu uso como antidiabético na forma de chá a ser ingerido continuamente. Esta indicação lhe valeu o nome popular de “insulina vegetal” e admite-se que ela esteja baseada na ocorrência de certos flavonóides no chá preparado com o vegetal (BARBOSA *et al.*, 2002).



Figura 1 - Detalhe dos ramos com flores de *Cissus verticillata*.
Fonte: Silveira (2005)



Figura 2 - Detalhe dos ramos com frutos jovens de *Cissus verticillata*.
Fonte: Silveira (2005)



Figura 3 - Detalhe dos frutos jovens de *Cissus verticillata*
Fonte: Silveira (2005)



Figura 4 - Detalhe dos frutos maduros de *Cissus verticillata*.
Fonte: Silveira (2005)



Figura 5 - *Cissus verticillata* com aspecto que justifica o nome popular “cortina-de-pobre”
Fonte: Silveira (2005)

1.2.2. Farmacologia pré-clínica de *Cissus verticilata* e constituintes químicos

Ensaio farmacológicos preliminares demonstraram que o extrato aquoso é ativo, enquanto a presença do álcool resulta num extrato inativo. Além disso, o extrato aquoso da planta demonstrou atividade anticonvulsivante, inibindo as convulsões induzidas por metrazole e choque elétrico em animais de laboratório (ELIZABETSKY, 1984;1988).

Estudos mostraram que o extrato aquoso de *C. sycioides* contrai anéis aórticos isolados de cobaia de uma maneira dose dependente. Estes autores concluíram que o extrato age a nível de membrana, aumentando a entrada de cálcio através da membrana como também agindo nos depósitos internos de cálcio, tais como o retículo sarcoplasmático (GARCIA *et al.*,1997)

O extrato aquoso de *C. sycioides* mostrou efeito antiinflamatório no modelo do edema de pata induzido por carragenina (um modelo para inflamação geral) e no edema de orelha de camundongo (um modelo de inflamação tópica). Estes autores também observaram uma diminuição no nível de mieloperoxidase em amostras de tecido na área de inflamação (GARCIA *et al.*, 2000) Enquanto Saenz *et al.* (2000) demonstrou atividade citostática em *C. sycioides* contra Hep-cells, Lizama, Martinez e Pérez (2000), não detectaram qualquer atividade antiviral contra o vírus da influenza tipo A nestas espécies.

O extrato aquoso de *C. sycioides* apresenta atividade antinociceptiva nos testes das contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e placa quente em camundongos. Foi mostrado também que o extrato tem propriedade anticonvulsivante evidenciado nos modelos das convulsões por pentilenotetrazol e estriçnina em camundongos (MEDEIROS *et al.*, 2002).

Silva (1995) não observou efeito hipoglicêmico quando deu o extrato aquoso das folhas e caule liofilizado para ratos normais no teste de tolerância a glicose. Dados posteriores confirmam a falta de efeito hipoglicêmico quando o extrato etanólico liofilizado foi administrado para ratos normais submetidos ao tratamento com dexametasona no teste de tolerância a glicose (BELTRAME *et al.*, 2001). Entretanto, Silva (1995) não descartou a possibilidade de que o excesso de glicose pode ser reduzido pela administração do extrato aquoso (chá), visto que um grande número de pacientes diabéticos afirma ter controlado a doença com o uso do chá.

Já no estudo de Barbosa *et al.* (2002), foi demonstrado que o chá das folhas de *C. verticillata* apresentou ação hipoglicemiante em ratos considerados normoglicêmicos, e provavelmente desenvolve efeito semelhante em humanos, sendo que este efeito ocorre devido a presença de flavonóides na planta. Neste estudo foram isolados três flavonóides: Canferol, luteonina e luteonina-3-sulfato.

O estudo realizado com ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina (PEPATO *et al.*, 2003) demonstrou que o decocto das folhas de *C. sycioides* dado a ratos na água de beber reduziu a ingesta de alimentos e água, bem como os níveis de glicose sanguínea e urinária e uréia. Já os níveis de lipídios e glicogênio hepático não foram alterados em animais diabéticos o que indica que o mecanismo responsável pela melhora no metabolismo dos carboidratos não envolve a inibição da glicogenólise e/ou estimulação da glicogênese. O fato de que animais normais tratados com *C. sycioides* não exibiram mudanças nos parâmetros acima mencionados sugere que o modo de ação não é semelhante ao das sulfoniurêias. Isto significa que ele pode agir de maneira similar as biguanidas, via inibição da gliconeogênese.

O extrato aquoso de *C. sycioides* administrado por 7 dias na dose de 100 e 200 mg/kg,v.o. a ratos diabéticos induzidos com aloxano, causou redução nos níveis de glicose e triglicerídios, enquanto que a administração só foi eficaz durante 4 dias quando a dose de 200 mg/kg foi administrada (VIANA *et al.*, 2004).

Os relatos da literatura mostram que. os principais componentes da parte aérea de *Cissus verticillata* são taninos, esteroides-triterpenos, aminoácidos, lipídios e flavonóides (canferol, luteonina e luteolina-3-sulfato), (LIZAMA; MARTINEZ; PÉREZ, 2000; BARBOSA *et al.*, 2002). Estudos anteriores (WENIGER; SABARY; SATURNY, 1984) detectaram a presença de esteróides, terpenos, quinonas e compostos fenólicos em *Cissus verticillata*, enquanto outros não mostraram alcalóides na planta e cianidinas somente no fruto (TOLEDO *et al.*, 1983; PINEDA *et al.*, 1989). Beltrame *et al.* (2001) e Beltrame, Ferreira e Cortez (2002), isolaram um novo glicosídeo cumarínico (5,6,7,8 tetrahidroxicumarina-5-beta-xylo-piranosídeo) da parte aérea desta planta.

A análise fitoquímica do extrato metanólico de *C. sycioides* levou ao isolamento e identificação de hidroxy stilbene resveratrol (QUILEZ *et al.*, 2004). O perfil fitoquímico das folhas frescas mostrou que a planta possui taninos e flavonóides (VIANA *et al.*, 2004).

Recentemente uma nova substância foi isolada de *Cissus verticillata*, no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará: a tiramina. A nova

substância foi isolada a partir do decocto das folhas da fração solúvel em metanol (ALEXANDRE, 2006).

1.3 Tiramina

A tiramina é uma amina (**Figura 6**) naturalmente encontrada no organismo e também em muitos alimentos. As mais altas concentrações de tiramina são encontradas em queijos envelhecidos e carne velha, mas existem outras fontes alimentares de tiramina, incluindo bebidas alcoólicas, algumas frutas e vegetais, chocolate, e muitos outros. Em insetos a tiramina mostra um papel similar como neurotransmissor ao papel que a adrenalina mostra em humanos, enquanto a octopamina um equivalente da norepinefrina no inseto. Devido ela ter sido reconhecida como um neurotransmissor cerca de uma década atrás, comparativamente pouco é conhecido sobre a tiramina (ROEDER *et al.*, 2003).

Em humanos a tiramina vem de fontes dietéticas ou é derivada do aminoácido tirosina. Ela é posteriormente metabolizada em octopamina e ultimamente em sinefrina. Como outras aminas, as ações biológicas da tiramina são geralmente atribuídas a sua ação como “falso neurotransmissor” e a relevância de sua ação no receptor da amina traço não é bem conhecida. A ação primária estabelecida da tiramina é a aumentada liberação de norepinefrina (NE). A tiramina é ativamente transportada dentro dos neurônios e desloca NE, conduzindo a liberação intraneuronal de NE (MECK *et al.*, 2003). Após a infusão de tiramina em humanos, níveis sanguíneos de NE aumenta de forma dose-dependente. Níveis sanguíneos de epinefrina também aumentam, mas o efeito é muito pequeno (JACOB *et al.*, 2003). A presente evidência experimental indica que a tiramina não é um agonista ou antagonista direto a qualquer subtipo de receptor (VISENTIN *et al.*, 2003). Porque ela aumenta NE, é possível que a tiramina aumenta a perda de gordura, mas nenhum estudo tem ainda examinado isto diretamente.

Tiramina pode também independentemente aumentar dopamina (DA), mas este efeito não é ainda bem estabelecido. Tiramina pode ser convertida enzimaticamente a dopamina no fígado via enzima CYP4502D6, mas não está claro se os níveis de dopamina podem ser significativamente aumentados in vivo através deste mecanismo. Outra possibilidade é que a tiramina causa liberação através do mesmo mecanismo o qual ela aumenta NE. Administração endovenosa de tiramina tem sido documentada por aumentar os

níveis sanguíneos de DA (JACOB *et al.*, 2003). Entretanto muitos pesquisadores têm encontrado que amostras de tiramina foram contaminadas com dopamina, e embora o grau de contaminação tenha sido pequeno ($< 1\%$), ele foi bastante significativo para aumentar os níveis sanguíneos de DA. Quando a tiramina foi estocada apropriadamente, nenhum efeito claro sobre os níveis de DA poderia ser encontrado. Estudos *in vitro* e em animais também indicam que a tiramina aumenta DA, mas eles podem ter sido sujeito aos mesmos problemas de contaminação (GOLDSTEIN *et al.*, 2002).

Em adição aos níveis de aumento dos neurotransmissores, tiramina tem também ações biológicas através de sua interação com monoamino oxidase (MAO). Existem duas isoformas desta enzima, MAO-A e MAO-B, a tiramina é oxidada por MAO-A (MORIN *et al.*, 2002). Isto pode resultar em uma produção local de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) o qual pode ter um efeito insulín-like sobre alguns tipos de células. Em adipócitos (células de gordura), tiramina estimula o transporte de glicose, a lipogênese (formação de gordura), e inibe a lipólise (quebra da gordura) um efeito que pode ser bloqueado pelos inibidores da MAO (MAOIs) ou antioxidantes tais como a glutatona e N-acetilcisteína, o qual previne a formação de H_2O_2 (VISENTIN *et al.*, 2003; MORIN *et al.*, 2002). Um estudo contradiz isto, indicando que a tiramina aumenta H_2O_2 em adipócitos mas, também aumenta a formação de AMPc mediado por forskolin (o qual é lipolítico) e a lipólise mediada beta-adrenergica. A discrepância pode ser explicada pelas diferentes concentrações de tiramina usada (VISENTIN *et al.*, 2003).

A tiramina também estimula a captação de glicose em outros tecidos sensíveis à insulina, tais como cardiomiócitos e músculo esquelético. Embora o tecido muscular tenha relativamente baixa atividade da MAO, ela conta com uma significativa proporção de massa corporal e o conteúdo total de MAO no músculo esquelético é mais alto em qualquer outro órgão ou tecido do que no fígado (MORIN *et al.*, 2002). Como pode ser esperado de uma substância que aumenta a NE, a tiramina também afeta o sistema cardiovascular quando dado em quantidade suficiente. A administração sistêmica de tiramina conduz ao aumento da pressão sanguínea e frequência cardíaca, e uma excessiva quantidade poderia conduzir a um ataque cardíaco (VANDENBERG *et al.*, 2003). A tiramina foi também usada como modelo de ativação do sistema nervoso simpático. Apesar de ser uma substância vasoconstritora, tiramina conduz a vasodilatação. Ela aumenta a pressão sanguínea sistólica, mas não tem efeito consistente sobre a pressão sanguínea diastólica, e a frequência cardíaca são somente moderadamente aumentadas. Esta inconsistência não tem sido ainda bem explicada, embora

um efeito sobre a liberação de dopamina tenha também sido sugerido como possível explicação (JACOB *et al.*, 2003).

Os efeitos cardiovasculares da tiramina de fontes da dieta são improváveis de ter significância, como o sistema MAO é altamente eficiente. O uso moderado de suplementos não tem muitos efeitos sobre o sistema cardiovascular. Pessoas em jejum necessitam de 500 mg de tiramina oral para um aumento mínimo da pressão sanguínea, e tomando tiramina com alimentos diminui a biodisponibilidade pela metade. Entretanto, naqueles que estão sendo tratados com inibidores da MAO (primariamente usados como antidepressivos) podem conseguir uma reação hipertensiva com pouco menos do que 10mg, enquanto que um alimento pode conter muito mais do que 20-40 mg. Outro efeito colateral da tiramina é a dor de cabeça, e por esta razão, uma dieta com pequena quantidade de tiramina é recomendada para aqueles os quais tem dores de cabeça freqüentes. Uma recente revisão de pesquisa disponível sobre aminas biogênicas e intolerância alimentar indicou que não houve evidência para a relação entre tiramina ou outras aminas biogênicas e reações de intolerância alimentar, incluindo dor de cabeça (JANSEN *et al.*, 2003). Entretanto, é plenamente possível que os suplementos com tiramina em grandes quantidades do que aqueles tipicamente encontrados em alimentos poderiam conduzir a dor de cabeça em indivíduos susceptíveis.

Em conclusão, a tiramina realmente aumenta NE, abrindo uma porta para um número possível de usos os quais ainda tem que ser explorados em literatura científica. É também muito provável que os níveis de dopamina aumentem independentemente, como sendo esta a melhor explicação para os efeitos cardiovasculares. Para aqueles que escolhem o uso da tiramina, uma dose de 200mg é recomendada, e significativa para aumentar os níveis no plasma (VANDENBERG *et al.*, 2003) e isto está bem dentro do limite saudável. Como com qualquer novo estimulante, a dose inicial deve ser bem baixa e aumentada como tolerada.

A tiramina já foi encontrada em algumas plantas, entre elas estão a *Sylibum mariano* (cardo mariano), *Musa paradisiaca* L. (bananeira) e *Citrus aurantium* L. (Laranja da Terra). Os usos populares destas plantas são: sudorífico, anti-espasmódico, carminativo, contra reumatismo e tosse, taquicardia, hemorróidas, asma, hemorragia, nefrite, hidropisia, inflamações de fígado, acidez gástrica e prisão de ventre (CARACTERÍSTICAS Y aplicaciones de las plantas, 2006).

Estudos recentes têm mostrado que a tiramina, exibe uma ação semelhante a insulina (insulin-like) em adipócitos, músculo esquelético e cardíaco; é também demonstrado que esta ação ocorre *in vivo* e influencia a disposição da glicose. Os efeitos metabólicos da

tiramina *in vitro* e *in vivo* são dependentes da oxidação pela Monoamina oxidase (MAO) ou amina oxidase sensível a semicarbazida (SSAO), as quais ocorrem não somente em órgãos bem reconhecidos por seu catabolismo das aminas (cérebro, fígado, rim, intestino e pulmão) mas também em tecidos capazes de aumentar a captação de glicose pela estimulação de insulina (tecido adiposo, cardíaco e muscular) (MORIN *et al.*, 2002).

O tratamento prolongado (três semanas) com tiramina em ratos diabéticos por estreptozotocina resultou em uma diminuição da resposta hiperglicêmica a sobrecarga de glicose i.p. Adipócitos isolados de ratos não tratados e sob tratamento foram sensíveis a estimulação da captação de glicose por tiramina. Entretanto, animais diabéticos recebendo tiramina por três semanas não recuperaram sua hiperglicemia, hipoinsulinemia e glicosúria. Estes resultados mostram que a melhora na tolerância a glicose induzida pela administração de tiramina por um período prolongado ocorre em um modelo depletado de insulina e provavelmente resulta de ações periféricas da insulina sobre a oxidação dos substratos MAO/SSAO, tais como a estimulação da captação de glicose dentro dos adipócitos (VISENTIN *et al.*, 2003).

Múltiplos estudos têm encontrado que a administração de tiramina para ratos diabéticos aumenta a disposição da glicose e reduz a hiperglicemia, um efeito o qual ocorre em doses que tenham pouco efeito sobre o sistema cardiovascular, e por esta razão tem sido sugerido como um possível tratamento para o diabetes (MORIN *et al.*, 2002; VISENTIN *et al.*, 2003).

Em estudos anteriores foi estabelecida a atividade antidiabética do extrato aquoso de *C. verticillata* (PEPATO *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002 e VIANA *et al.*, 2004) e justificado este efeito devido a presença de flavonóides (BARBOSA *et al.*, 2002; VIANA *et al.*, 2004). Entretanto, somente o trabalho de Beltrame *et al.* (2001) estudou substâncias isoladas de *C. verticillata* (flavonóides). Os autores avaliaram uma possível ação insulinogênica e nesse caso, os flavonóides (canferol e quercetina) diferentemente da insulina não estimularam a síntese de glicogênio em ratos. Assim, tendo em vista elucidarmos a atividade antidiabética da planta e com base no dado inédito que levou ao isolamento da tiramina à partir do extrato aquoso (ALEXANDRE, 2006) foram investigados a Fração solúvel em Metanol, Fração Rica em Tiramina e a Tiramina nos seus efeitos sobre a diabetes, analgesia, inflamação e estresse oxidativo.

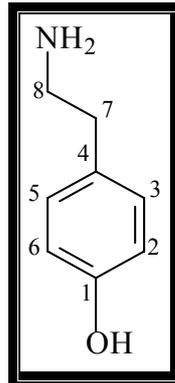


Figura 6 - Estrutura do 4-(2-aminoetil)fenol. Nome usual: Tiramina

1.4 Diabetes *mellitus* (DM)

1.4.1 Conceito e classificação

O diabetes *mellitus* (DM) não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006b).

As conseqüências do DM a longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira e/ou neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Pessoas com diabetes apresentam risco maior de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral (SBD, 2002).

Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda inexplicada de peso, poliúria, polidipsia e infecções. Mesmo em indivíduos assintomáticos poderá haver hiperglicemia discreta, porém em grau suficiente para causar alterações funcionais ou morfológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). O diagnóstico do DM deve ser baseado nos valores de glicose plasmática (em mg/dL) em jejum, 2 h após 75 g de glicose e casual, conforme **Tabela 2**.

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento, portanto os termos diabetes *mellitus* insulino dependente e diabetes *mellitus* insulino independente devem ser eliminados. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS)(1) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA)(2) aqui recomendada inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e diabetes *mellitus* gestacional (**Tabela 2**). Ainda existem duas categorias, referidas como prédiabetes, que são a *glicemia de jejum alterada* e a *tolerância à glicose diminuída*. Essas categorias não são entidades clínicas, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (DCV).

DM tipo 1 (DM1), forma presente em 5%-10% dos casos, é o resultado de uma destruição das células beta pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Na maioria dos casos essa destruição das células beta é mediada por auto-imunidade, porém existem casos em que não há evidências de processo auto-imune, sendo, portanto, referida como forma idiopática do DM1 (PALMER *et al.*, 1983; BAEKKESKOV *et al.*, 1990; RABIN, 1994). Além do componente auto-imune, o DM1 apresenta forte associação com determinados genes do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), alelos esses que podem ser predisponentes ou protetores para o desenvolvimento da doença (TODD; BELL; MCDEVITT, 1987).

Tabela 2 - Classificação Etiológica do diabetes mellitus (DM)

DM 1
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Auto-imune ▪ Idiopático
DM 2
Outros tipos específicos de DM
Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2006b)

O DM1 idiopático corresponde a uma minoria dos casos. Caracteriza-se pela ausência de marcadores de auto-imunidade contra as células beta e não-associação com haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos com essa forma de DM podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina.

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é a forma presente em 90%-95% dos casos e caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. A maioria dos pacientes com essa forma de DM apresenta sobrepeso ou obesidade, e cetoacidose raramente desenvolve-se espontaneamente, ocorrendo apenas quando associada a outras condições como infecções. O DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. Os pacientes não são dependentes de insulina exógena para sobrevivência, porém podem necessitar de tratamento com insulina para a obtenção de um controle metabólico adequado. Diferentemente do DM1 auto-imune não há indicadores específicos para o DM2.

Existem provavelmente diferentes mecanismos que resultam nessa forma de DM, e com a identificação futura de processos patogênicos específicos ou defeitos genéticos, o número de pessoas com essa forma de DM irá diminuir à custa de uma mudança para uma classificação mais definitiva em *outros tipos específicos de DM*. Pertencem a essa classificação formas menos comuns de DM cujos defeitos ou processos causadores podem ser identificados. A apresentação clínica desse grupo é bastante variada e depende da alteração de base. Estão incluídos nessa categoria defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidas por agentes químicos e infecções (SBD, 2006b).

O diabetes *mellitus* gestacional é qualquer intolerância à glicose, de magnitude variável, com início ou diagnóstico durante a gestação. Não exclui a possibilidade de a condição existir antes da gravidez, mas deve ser reavaliada quatro a seis semanas após o parto e reclassificadas como apresentando DM, glicemia de jejum alterada, tolerância à glicose diminuída ou normoglicemia. Na maioria dos casos há reversão para a tolerância normal após a gravidez, porém existe um risco de 17%-63% de desenvolvimento de DM2 dentro de 5-16 anos após o parto (HANNA; PETERS, 2002).

O pré-diabetes refere-se a um estado intermediário entre a homeostase normal da glicose e o DM. A categoria *glicemia de jejum alterada* refere-se às concentrações de glicemia de jejum que são inferiores ao critério diagnóstico para o DM, porém mais elevadas do que o valor de referência normal. A *tolerância à glicose diminuída* representa

uma anormalidade na regulação da glicose no estado pós-sobrecarga, que é diagnosticada através do teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que inclui a determinação da glicemia de jejum e de 2 horas após a sobrecarga com 75g de glicose (SBD, 2006b).

Os critérios diagnósticos para o diabetes são os seguintes: 1) Glicemia normal : entre 79 a 99 mg/dL e inferior a 140 mg/dL 2 h após sobrecarga de glicos; 2) Intolerância a glicose; glicemia de jejum entre 100 a 125 mg/dL; 3) diabetes: duas amostras de glicose colhidas em dias diferentes com resultado igual ou acima de 126 mg/dL ou quando a glicemia aleatória (feita a qualquer hora) estiver igual ou acima de 200 mg/dL na presença de sintomas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005; SBD, 2005). **Tabela 3**

Tabela 3 – Valores de glicose plasmática (em mg/dL) para diagnóstico de diabetes *mellitus* e seus estágios pré-clínicos

Categoria	Jejum	2 h após 75 g de glicose	Casual
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância a glicose Diminuída	> 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabetes <i>mellitus</i>	≥ 126	≥ 200	≥ 200 (com sintomas clássicos)

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2006b)

1.4.2 Resistência a Insulina e Síndrome Metabólica

A resistência à insulina, é uma condição fisiopatológica de grande repercussão clínica. Estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos que apresentam resistência à insulina têm chance maior de desenvolver diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2); alguns tipos de dislipidemia; hipertensão arterial; esteatohepatite não-alcoólica; doenças neurodegenerativas; algumas neoplasias, como de mama, pâncreas e cólon; e um risco cardiovascular aumentado

em duas a quatro vezes. Assim, tornou-se importante na prática clínica estabelecer se um paciente tem ou não resistência à insulina.

Nos últimos anos, diversos estudos epidemiológicos e fisiopatológicos demonstraram que indivíduos com resistência à insulina apresentam valores elevados de marcadores inflamatórios, destacando-se a proteína C-reativa (PCR) como o mais usado. Ainda não há consenso quanto ao uso desse marcador como medida adicional para o diagnóstico de resistência à insulina, e a maioria dos estudos aponta vantagens, ainda que reduzidas, de se associar essa determinação a outros critérios. Para a prática clínica, a utilização de PCR deve seguir as recomendações do Seminário de Marcadores Inflamatórios dos Centros de Prevenção e Controle de Doenças, da American Heart Association (AHA), as quais, entretanto, não são específicas para situações de resistência à insulina (SBD, 2006b).

Finalmente, merece destaque a síndrome metabólica (SM), que tem como base fisiopatológica a resistência à insulina, mas que não é obrigatoriamente sinônimo dessa resistência hormonal. A presença de SM consegue prever o desenvolvimento futuro de DM2 e de doença coronariana. Há três definições de SM, mas duas são mais utilizadas em estudos clínicos: a do National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III) e a da Organização Mundial da Saúde (OMS). Com base nos critérios do NCEP-ATP III, tem SM quem apresenta três dos cinco fatores de risco: a) circunferência abdominal $> 102\text{cm}$ em homens e $> 88\text{cm}$ em mulheres; b) hipertrigliceridemia $\geq 150\text{mg/dl}$; c) lipoproteína de alta densidade (HDL) $< 40\text{mg/dl}$ para homens e $< 50\text{mg/dl}$ para mulheres; d) pressão arterial (PA) $> 130/85\text{mmHg}$ ou uso de medicação anti-hipertensiva; e) glicose plasmática de jejum $> 110\text{mg/dl}$ (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Identificação clínica da síndrome metabólica

Fatores de risco	Nível de definição
Obesidade abdominal	
Homem	> 102 cm
Mulher	> 88 cm
Triglicerídios	≥ 150 mg/dL
HDL-colesterol	
Homem	< 40 mg/dL
Mulher	< 50 mg/dL
Pressão arterial	≥ 130 x 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivo
Glicemia de jejum	> 110 mg/dL
Condições necessárias ao diagnóstico	3 fatores

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2006b)

1.4.3 Prevalência do DM no Mundo e no Brasil

O DM é um importante problema de importância crescente em saúde pública. Sua incidência e prevalência estão aumentando, alcançando proporções epidêmicas. Está associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Além disso, acarreta altos custos para seu controle metabólico e tratamento de suas complicações (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2002).

Os dados abaixo refletem a grande importância médico-econômico-social do diabetes no contexto da saúde pública:

- *Diabetes melitus* como o diagnóstico primário de internação hospitalar aparece como a sexta causa mais freqüente e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (SILVESTRE, 1997);
- Pacientes diabéticos representam cerca de 30% dos pacientes que se internam em unidades coronarianas intensivas com dor precordial;
- Diabetes é a principal causa de amputações de membros inferiores (SPICHLER, 1998); é, também, a principal causa de cegueira adquirida.

▪ Cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos (BRUNO; GROSS, 2000).

Em 1985 estimava-se que existissem 30 milhões de adultos com DM no mundo; esse número cresceu para 135 milhões em 1995, atingindo 173 milhões em 2002, com projeção de chegar a 300 milhões no ano 2030. Cerca de dois terços desses indivíduos com DM vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993, 2001).

O número de indivíduos diabéticos está aumentando devido ao crescimento e ao envelhecimento populacional, à maior urbanização, à crescente prevalência de obesidade e sedentarismo, bem como à maior sobrevivência do paciente com DM. Quantificar a prevalência de DM e o número de pessoas diabéticas, no presente e no futuro, é importante para permitir uma forma racional de planejamento e alocação de recursos. No Brasil, no final dos anos 1980, a prevalência de DM na população adulta foi estimada em 7,6% (DCCT Research Group, 1993); dados mais recentes apontam para taxas mais elevadas, como 12,1% no estudo de Ribeirão Preto, SP (DCCT Research Group, 2001). A influência da idade na prevalência de DM e na tolerância à glicose diminuída foi bem evidenciada pelo Estudo Multicêntrico sobre a Prevalência do Diabetes no Brasil (DCCT Research Group, 1993), no qual se observou variação de 2,7% para a faixa etária de 30-59 anos e de 17,4% para a de 60-69 anos, ou seja, um aumento de 6,4 vezes.

No mundo, o número de mortes atribuídas ao DM está em torno de 800 mil; entretanto é fato bem estabelecido que essa quantidade de óbitos é consideravelmente subestimada. Frequentemente o DM não é mencionado na declaração de óbito pelo fato de serem suas complicações, particularmente as cardiovasculares e cerebrovasculares, as causas da morte. E são essas causas que figuram nas estatísticas de mortalidade. Uma figura mais realista sugere cerca de 4 milhões de óbitos anuais relacionados à presença dessa doença, com importante contribuição de complicações cardiovasculares. Isso corresponde a aproximadamente 9% do total mundial de mortes. A maioria desses óbitos é prematura, ocorrendo quando os indivíduos estão contribuindo economicamente para a sociedade. Dados brasileiros mostram que as taxas de mortalidade por DM (por 100 mil habitantes) apresentam acentuado aumento com o progredir da idade, variando de 0,58 para a faixa etária de 0-29 anos até 181,1 para a de 60 anos ou mais, ou seja, um gradiente superior a 300 vezes. Na maioria dos países desenvolvidos, quando se analisa apenas a causa básica do

óbito, verifica-se que o DM, entre as principais, figura entre a quarta e a oitava posição (SBD, 2006).

Os custos diretos com DM variam entre 2,5% e 15% do orçamento anual da saúde, dependendo de sua prevalência e do grau de sofisticação do tratamento disponível. Estimativas do custo direto para o Brasil estão em torno de 3,9 bilhões de dólares americanos, em comparação com 0,8 bilhão para a Argentina e 2 bilhões para o México (VIVOLO; FERREIRA; SUSTOVICH, 1993).

Combinando as estimativas para 25 países latino-americanos, pode-se inferir que os custos decorrentes da perda de produção pela presença do DM podem ser cinco vezes maiores do que os diretos (VIVOLO; FERREIRA; SUSTOVICH, 1993). Isso se deveria ao acesso limitado à boa assistência à saúde, com conseqüente elevada incidência de complicações, incapacitações e morte prematura (SBD, 2006b).

1.5 Modelos Experimentais de *Diabetes*

Von Mering (1890) trabalhava em experimentos sobre absorção de gorduras do intestino quando Minkowski sugeriu a remoção do pâncreas do cachorro. Após a cirurgia o animal desenvolveu poliúria e polidipsia e em seguida desenvolveu *diabetes mellitus*. Muitos experimentos foram feitos com coelhos e cães, embora a história tem dado especial atenção a Marjorie, um dos cães utilizados por Banting e Best nos experimentos de isolamento e purificação da insulina em 1920 (BLISS, 2000). Marjorie é provavelmente um dos animais mais famosos na história, sendo superado somente por Dolly, o carneiro, nos anos recentes.

Um dos mais simples caminhos de estudar os efeitos da hiperglicemia é remover o pâncreas parcial ou total. A espécie de animal utilizada é determinada por muitos fatores. Em geral o animal que seja mais fácil de manusear e de baixo custo. Portanto, os animais mais utilizados são ratos e camundongos pancreatomizados.

Existem métodos capazes de induzir a hiperglicemia através de toxinas entre elas podemos citar a estreptozotocina e o aloxano (JUNOD *et al.*, 1969; LENZEN; PATEN, 1988). A estreptozotocina é um derivado da nitrosuréia isolado da *Streptomyces achromogenes achromogenes* com atividade antineoplásica e antibiótica de amplo espectro (BONO, 1976). Uma única dose de estreptozotocina pode produzir diabetes em roedores provavelmente devido os seus efeitos tóxicos diretos. Geralmente pequenas doses de

estreptozotocina são usadas (ex. 40 mg/kg i.p. ou i.v. por 5 dias consecutivos). Em roedores susceptíveis isto induz a uma insulinemia com destruição do sistema imune é semelhante ao que ocorre em humanos com DM1 (YANG *et al.*, 2003; MENSAH-BROWN *et al.*, 2002; MULLER *et al.*, 2002; HOLSTAD; SANDLER, 2001; ZUCCOLLO *et al.*, 1999; HEROLD; LENSCHOW; BLUESTONE, 1997).

O mecanismo preciso de ação diabetogênica da estreptozotocina e aloxano ainda não é plenamente entendido. As pesquisas mostram que a diabetes induzido por estreptozotocina e aloxano é ocasionada pela ação β -citotóxica nas ilhotas de Langerhans, embora muitos achados sugerem que os mecanismos de ação diabetogênica sejam diferentes. A cetose ou elevação dos ácidos graxos livres no plasma não ocorre em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (BELL JR; HYE, 1983). A estreptozotocina tem uma alta especificidade como um agente β -citotóxico no rato. Diferentemente do aloxano a estreptozotocina depletou os níveis de nicotinamida adenina de nucleotídeo (NAD) no fígado de camundongos (SANDLER; SWENNE, 1983).

O dano pancreático através de métodos cirúrgicos e/ou mediado por toxinas são valorosas ferramentas no estudo da hiperglicemia, por exemplo no desenvolvimento de complicações diabéticas (SALGADO *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2001; REAGAN; MAGARINOS; MCEWAN, 1999; FLYVBJERG *et al.*, 1995; GARCIA-MARTIN; VILLANUEVA; ESTELLER, 1988).

Muitas pesquisas com transplante de ilhotas tem usado roedores. As ilhotas podem ser transportadas com ou sem as cápsulas designadas para inibir a rejeição (LANZA *et al.*, 1999), subcutâneamente (TRIMBLE *et al.*, 1980), sob a cápsula renal ou semeada pela veia porta dentro do fígado. Aos animais pode ser dada uma variedade de terapias anti-rejeição (MAEDA *et al.*, 2003; WENNBERG *et al.*, 2001; JAHR *et al.*, 2002). Diferentemente do estudo de alto padrão, como o transplante de ilhotas, roedores diabéticos são rotineiramente usados na avaliação de novos agentes farmacológicos com papel potencial para tratar doenças em humanos. Assim, todos os novos agentes ativos por via oral serão testados para eficácia e segurança em modelos com roedores. Algumas vezes isto conduz a achados interessantes e inesperados, tais como a possibilidade de que os agonista PPAR γ possam preservar a quantidade de células β (FINEGOOD *et al.*, 2001). Por outro lado, resultados indesejados são obtidos, como o desenvolvimento de tumores em ratos tratados com insulina (HANSEN *et al.*, 1996).

Os camundongos diabéticos *non obese* (NOD) e os ratos *bio breeding* (BB) são as duas espécies mais comumente usadas de animais que desenvolvem a doença espontaneamente com similaridade ao diabetes tipo 1 no ser humano. Estes animais tem sido reproduzidos em laboratórios por muitas gerações. Os camundongos NOD foram desenvolvidos a partir de animais selecionados e descendentes de uma raça que foi primeiro utilizado no desenvolvimento de catarata (MAKINO *et al.*, 1980).

Os modelos animais de diabetes tipo 2 são tão complexos e heterogêneos como a condição humana. Modelos onde a intolerância a glicose é parte de um amplo fenótipo de obesidade, dislipidemia e hipertensão pode fornecer valorosas ferramentas no estudo do diabetes tipo 2. Como com o camundongo NOD e o rato BB rat no diabetes tipo 1, a reprodução seletiva de animais que desenvolvem espontaneamente fenótipo como diabetes tipo 2 tem gerado muitas raças utilizada nos dias de hoje. Muito pode ser aprendido de animais com uma única mutação genética, como evidenciado pelas vantagens nos avanços no conhecimento gerado do estudo das raças *ob/ob*, *db/db*, *fa/fa* and *agouti* (LEIBEL; CHUNG; CHUA, 1997; CHAGNON; BOUCHARD, 1996; ZHANG *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1996; PHILLIPS *et al.*, 1996).

A obesidade e a consequente resistência a insulina é a principal causa do diabetes em humanos. Conseqüentemente, modelos animais de obesidade tem sido usados na tentativa de conseguir melhorias no tratamento do diabetes. Algumas raças de animais mantêm a euglicemia por aumentar a resposta compensatória das células β mediante a resistência insulínica como hiperinsulinemia. Os camundongos *ob/ob* e ratos *fa/fa* são bons exemplos desse fenômeno. Outros tais como os camuindongos *db/db* e *Psammomys obesus* rapidamente desenvolvem hiperglicemia como rapidamente suas células β são incapazes de manter os níveis de secreção de necessárias a vida (ZHANG *et al.*, 1994; LEE *et al.*, 1996; PHILLIPS *et al.*, 1996).

O rato *Goto kakizaki* (GK) foi desenvolvido por uma raça selecionada de ratos Wistar com uma glicose sanguínea mais alta através de muitas gerações (GOTO *et al.*, 1976). Os ratos desenvolvem uma relativa hiperglicemia estável na vida adulta (MRIALES; PORTHA, 2001).

O camundongo KK é outro animal utilizado nos expeimentos de diabetes. Ele é um animal que torna-se gradualmente obeso na vida adulta, associado com a resistência a insulina, hiperinsulinemia compensatória e hiperplasia das ilhotas (NAKAMURA; YAMADA, 1967; IKEDA, 1994).

Os camundongos Nagoya–Shibata–Yasuda desenvolvem o diabetes espontaneamente. As características chave inclui o prejuízo na secreção de insulina em relação a leve resistência a insulina. A obesidade é a principal característica destes animais e existe uma marcada diferença de gênero com quase todos os machos desenvolvendo hiperglicemia, e menos do que dois terço das fêmeas. Esta diferença de gênero é uma característica generalizada para a maioria dos modelos de diabetes tipo 2 (UEDA *et al.*, 1995).

As técnicas de biologia molecular tem avançado com a explosão de vários modelos em animais para o estudo do diabetes. O gene alvo se refere ao processo pelo qual um único gene pode ser interrompido durante o processo de célula tronco embrionária e transmitido ao lado de uma linhagem de células bacterianas. Isto produz os animais “Knockout”. Os transgênicos se referem a incorporação de genes modificados (transgenes) dentro de pró-núcleos de um zigoto. O transgene é aleatoriamente incorporado no genoma do hospedeiro e alguns descendentes expressarão o gene modificado. Usando estes enfoques, um amplo número de animais tem sido produzidos na tentativa de conseguir informações na patogênese de ambos diabetes tipo 1 e 2 (REES; ALCOLADO, 2005).

Outro campo importante na pesquisa de diabetes que tem aliviado profundamente a experimentação animal é o estudo do diabetes em grávidas e o papel do ambiente intra uterino no subsequente desenvolvimento do diabetes entre descendentes. Primeiramente, tem sido mostrado que o diabetes em grávidas predispõe ao desenvolvimento do diabetes nos descendentes. Portanto, filhotes nascidos de ratas que se tornaram diabéticas pelo tratamento com estreptozotocina são mais prováveis de se tornarem diabéticos na vida adulta do que uma ninhada nascida da mesma mãe antes dela ter recebido a estreptozotocina (BOLOKER; GERTZ; SIMMONS, 2002).

Existem poucas dúvidas de que alguns modelos animais de diabetes têm fornecido informações valiosas sobre a patogênese da doença em humanos. Os pacientes têm se beneficiado diretamente do uso de animais no descobrimento da insulina e a avaliação de outros tratamentos. Entretanto ainda existem alguns questionamentos como a falta de paradigmas reproduzíveis das complicações diabéticas em humanos e os desapontamentos nos estudos da prevenção do diabetes tipo 1 baseada no sucesso dos experimentos em roedores (REES; ALCOLADO, 2005).

1.6 Tratamento do DM

O tratamento do DM inclui as seguintes estratégias: educação; modificações do estilo de vida, que incluem suspensão do fumo, aumento da atividade física e reorganização dos hábitos alimentares; e, se necessário, uso de medicamentos. O tratamento concomitante de outros fatores de risco cardiovascular é essencial para a redução da mortalidade cardiovascular. O paciente deve ser continuamente estimulado a adotar hábitos de vida saudáveis (manutenção de peso adequado, prática regular de exercício, suspensão do fumo e baixo consumo de bebidas alcoólicas). Mudança no estilo de vida é difícil de ser obtida, mas pode ocorrer se houver uma estimulação constante ao longo do acompanhamento, e não apenas na primeira consulta. Isto é particularmente importante, porque o UK Prospective Diabetes Study Group (UKPDS) demonstrou que após o aparecimento do DM há uma piora progressiva e inexorável do controle glicêmico, independente do emprego de agentes antidiabéticos (UKPDS, 1998). É possível que esta piora possa ser atenuada ou evitada com modificações no estilo de vida (perda de peso e incremento na atividade física) (TUOMILEHTO *et al.*, 2001) e/ou com o uso de medicamentos Hipoglicemiantes (CHIASSON *et al.*, 2002).

1.6.1 A Insulina

A insulina é uma pequena proteína com um peso molecular humano de 5808. Ela contém 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias (A e B) ligadas por pontes de sulfeto. A pro-insulina, uma molécula proteica de cadeia longa é processada dentro do aparelho de Golgi e armazenada dentro dos grânulos, onde é hidrolisada em insulina e um segmento de conexão residual chamado peptídio-C (**Figura 7**). A insulina e o polipeptídio-C são secretados em quantidades equimolares em resposta aos secretagogos da insulina; uma pequena quantidade de pró-insulina não processada ou parcialmente hidrolizada é liberada também. Embora a pró-insulina possa ter alguma ação hipoglicêmica, o peptídio-C não tem função fisiológica conhecida. O pâncreas humano contém acima de 8mg de insulina, representando aproximadamente 200 unidades biológicas (NOITE; KARAN, 2007).

A insulina é liberada das células pancreáticas numa baixa taxa basal e numa taxa mais alta em resposta a uma variedade de estímulos, especialmente glicose. Outros estimulantes tais como outros açúcares (ex.manose), certos aminoácidos (ex.leucina e

arginina) hormônios tais como o polipeptídeo1 glucagon-like e a atividade vagal. A hiperglicemia resulta num aumento nos níveis de ATP intracelular, os quais fecham os canais de potássio dependente de ATP. A saída reduzida do potássio resulta em despolarização da célula β e abertura dos canais de cálcio operado por voltagem. O aumento do cálcio intracelular conduz a secreção do hormônio. O grupo dos secretagogos da insulina (sulfoniuréias, metiglinidas e D-fenilalanina) exploram parte deste mecanismo (DAVIS, 2006).

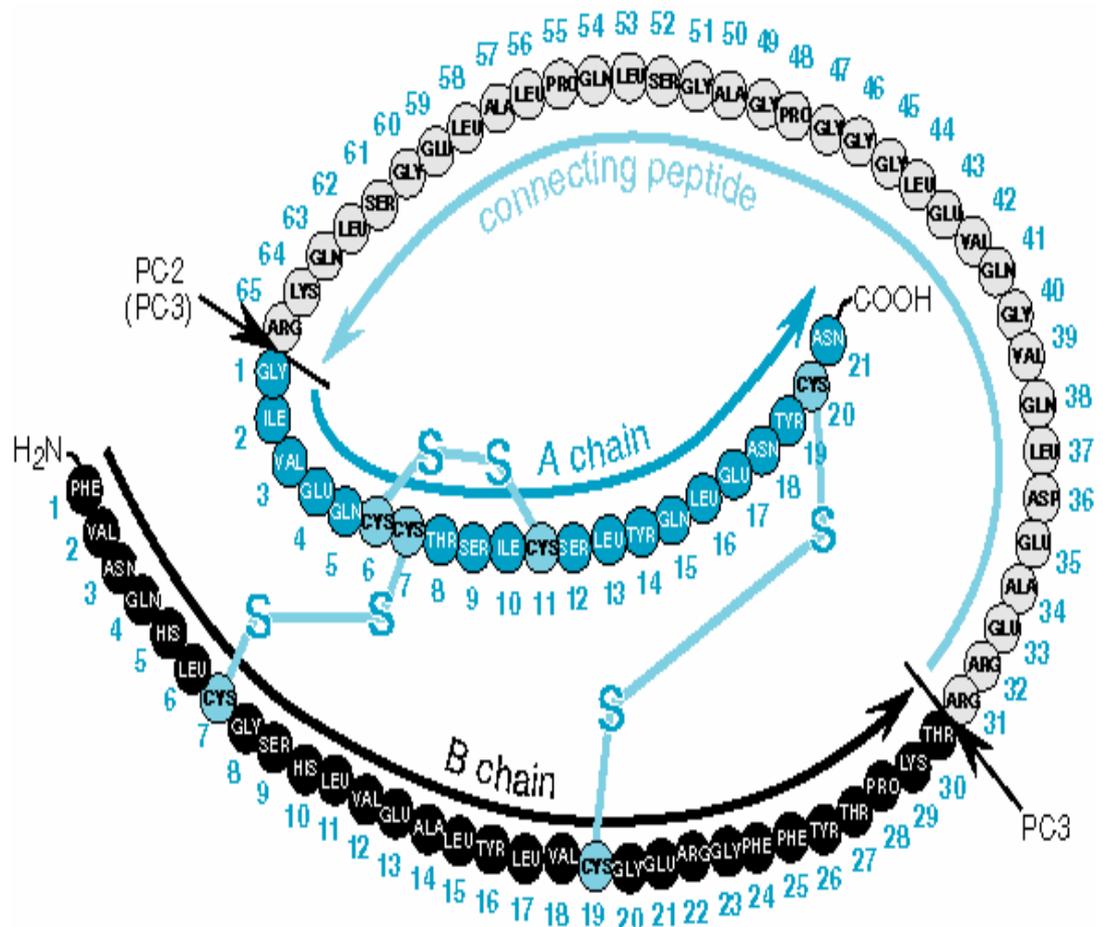


Figura 7 - Pró-insulina humana e sua conversão em insulina

Fonte: Davis (2006)

A figura mostra a seqüência dos aminoácidos da pró-insulina humana. Através de clivagem proteolítica, são removidos quatro aminoácidos básicos (resíduos 31, 32, 64 e 65) e o peptídeo conectivo, convertendo a pró-insulina em insulina. São também mostrados os locais das endopeptidases PC2 e PC3.

O fígado e rim são os principais órgãos que removem a insulina da circulação. O fígado normalmente remove cerca de aproximadamente 60 % da insulina liberada do pâncreas em virtude de sua localização, como o sítio terminal do fluxo sanguíneo da veia porta, com o rim removendo 35-40 % do hormônio endógeno. Entretanto em indivíduos diabéticos tratados com insulina subcutânea, esta taxa é revertida, ou seja mais de 60 % da insulina exógena é liberada pelo rim e o fígado remove não mais do que 30-40 % (NOITE; KARAN, 2007).

Após a insulina entrar na circulação sanguínea, ela se difunde nos tecidos, onde se liga através de receptores especializados que são encontrados na membrana da maioria dos tecidos. A resposta biológica promovida por este complexo insulina-receptor tem sido identificada nos tecidos-alvo primários, isto é, fígado, músculo e tecido adiposo. Os receptores se ligam a insulina com alta especificidade e afinidade no limite picomolar. O receptor da insulina consiste de dois heterodímeros ligados por ligação covalente, contendo uma subunidade α , a qual é inteiramente extracelular e uma subunidade β que é uma proteína transmembrana que ativa a proteína tirosina cinase. Após a insulina estar ligada, os receptores se agregam e são internalizados rapidamente (DAVIS, 2006; NOITE; KARAN, 2007).

O mecanismo intracelular de ação da insulina não é perfeitamente compreendido. Os receptores da insulina são receptores membrano-ligados com atividade de tirosina-cinase. Assim como outras cinase intracelulares, a fosforilação das proteínas intracelulares altera a atividade enzimática destas proteínas, resultando em etapas de fosforilação e desfosforilação através de uma cascata de sinalização intracelular. A ativação do receptor da insulina induz uma translocação dos transportadores de glicose de um sítio endossômico para a membrana plasmática, levando a um aumento de absorção de glicose. O controle dos transportadores de glicose é essencial para a liberação energética, ao passo que nas células β pancreáticas esse controle é essencial para o mecanismo de percepção da glicose, que controla a liberação de insulina (**Figura 8**). (PAGE *et al.*, 2004).

A insulina constitui a base do tratamento de praticamente todos os pacientes com DM tipo 1 e de muitos pacientes com DM tipo 2. Quando necessário a insulina pode ser administrada por vias intravenosa ou intramuscular; entretanto, o tratamento a longo prazo baseia-se predominantemente na injeção subcutânea do hormônio. A administração subcutânea da insulina difere da secreção fisiológica do hormônio em pelo menos dois aspectos importantes: a cinética não reproduz a rápida elevação e declínio normais da secreção de insulina em resposta à ingestão de nutrientes, e a insulina difunde-se na

circulação periférica, em lugar de ser liberada da circulação portal; por conseguinte, o efeito direto da insulina secretada sobre os processos metabólicos hepáticos é eliminado. Todavia, quando esse tratamento é ministrado com cuidado obtém-se um sucesso considerável (DAVIS, 2006)

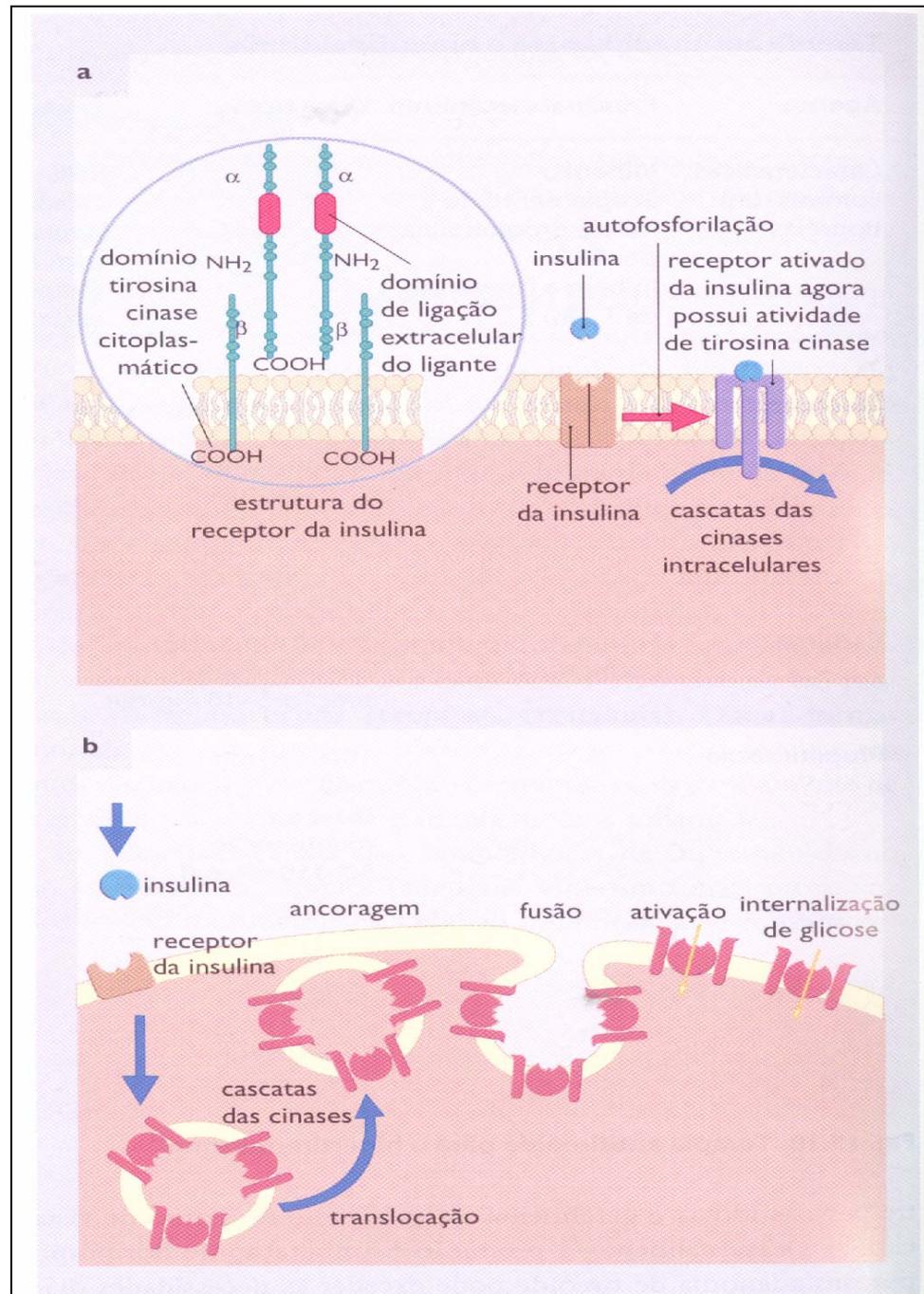


Figura 8 - Mecanismo de Ação da Insulina

Fonte: Page (2004)

Na figura 8 (a) o receptor da insulina é um receptor transmembrânico heterodimérico consistindo de duas subunidades α e duas subunidades β . As porções

intracelulares das subunidades β contêm atividade de tirosina-cinase. A estimulação do receptor da insulina resulta em fosforilação das múltiplas moléculas de sinalização intracelular. A fosforilação dos resíduos da tirosina-cinase nas cinases intra-celulares resulta em ativação das cascatas serina/treonina/cinase.(b) As cascatas das cinases intracelulares provocam a translocação dos transportadores de glicose de um compartimento endossômico para a membrana plasmática onde aumentam a absorção de glicose.

A insulina é sempre necessária no tratamento do DM1, devendo ser instituída assim que for feito o diagnóstico. O clássico estudo Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) provou que o tratamento intensivo do DM1, com três ou mais doses de insulina de ações diferentes, é eficaz em diminuir a frequência de complicações crônicas do DM, pois encontrou uma diminuição de 76% nos casos de retinopatia, 60% nos de neuropatia e 39% nos de nefropatia naqueles pacientes tratados intensivamente em relação aos tratados convencionalmente (DCCT, 1993).

As preparações de insulina podem ser classificadas, de acordo com a sua duração de ação, em preparações de ação curta, intermediária e longa, e de acordo com as espécies de origem, em humana e suína. Hoje a insulina humana está amplamente disponível como resultado de sua produção pela tecnologia recombinante. A insulina suína difere da insulina humana em 1 aminoácido (alanina em lugar de treonina na extremidade carboxiterminal de cadeia B, isto é, na posição B20). Antes da metade da década de 1970, as preparações de insulina disponíveis no comércio continham pró-insulina ou substâncias semelhantes ao glucagon, popilpeptídeo pancreático, somatostatina e peptídios intestinais vasoativos. Mas esses contaminantes foram evitados com o advento das insulinas suínas monocomponentes. No final da década de 1970 foi realizado um intenso trabalho para o desenvolvimento da insulina humana biossintética. Durante a última década, a insulina humana tornou-se rapidamente a forma padronizada de tratamento, e os produtos à base de insulina suína foram abandonados (DAVIS, 2006).

As insulinas de ação curta e de ação rápida são soluções de insulina zíncica cristalina regular (injeção de insulina) dissolvida habitualmente em um tampão, em pH neutro. Essas preparações são as que apresentam início de mais rápido de ação, porém duração mais curta. A insulina de ação curta (regular ou solúvel) deve ser injetada 30 a 45 minutos antes das refeições. A insulina regular também pode ser administrada por vias intravenosa ou intramuscular.

As insulinas de ação intermediária são formuladas para permitir uma dissolução mais gradual quando administradas por via subcutânea; por conseguinte, a sua duração de

ação é mais longa. As duas preparações utilizadas com maior frequência são a insulina com protamina neutral Hagedon (NPH) (suspensão de insulina isófana) e a insulina lenta (suspensão de insulina zíncica). As propriedades farmacocinéticas das insulinas de ação intermediária são ligeiramente diferentes daquelas das preparações de insulina suína. As insulinas humanas apresentam início de ação mais rápido e de duração de ação mais curta do que as insulinas suínas. Em geral, as insulinas de ação intermediária são administradas 1 vez/dia, antes do desjejum ou 2 vezes/dia (DAVIS, 2006).

A insulina ultralenta (suspensão de insulina zíncica ampliada) e a suspensão de insulina zíncica com protamina são insulinas de ação longa; apresentam início de ação mais lento e de pico de ação mais prolongado. Essas insulinas foram recomendadas para proporcionar uma concentração basal mais baixa de insulina durante todo o dia. A insulina zíncica é raramente utilizada hoje devido a seu curso de ação prolongado e muito imprevisível.

As opções terapêuticas de análogos de insulina atualmente disponíveis no tratamento do diabetes pode ser dividido em três tipos: análogos de insulina de longa duração; análogos de insulina de curta duração; análogos bifásicos e insulina inalável (SBD, 2006a)

Os análogos de longa duração, são também denominados de basais, que são a insulina glargina e a insulina detemir. A principal função da insulina basal é regular a homeostase hepática da glicose no estado de jejum ou entre as refeições, mimetizando o que ocorre com a secreção fisiológica de insulina pelas células beta-pancreáticas em indivíduos não diabéticos saudáveis.

A insulina glargina tem um início de ação de aproximadamente duas horas. Ela é relativamente plana e isenta de pico, comparada com a insulina NPH (Neutral Protamine Hagedron) e é lentamente absorvida e liberada para a circulação, alcançando um platô de ação biológica em 4 a 6 horas e durando até 24 horas (OIKINE; BERNBAUM; MOORADIAN, 2005). Em termos de segurança de uso quanto ao potencial mitogênico, na maioria dos tipos celulares testados *in vitro*, a atividade mitogênica foi similar entre a insulina glargina e a insulina regular humana (DUNN *et al.*, 2003).

A Insulina detemir dissocia-se do receptor de insulina duas vezes mais rápido do que a insulina humana *in vitro* e, como resultado, a insulina detemir demonstrou menor potência metabólica do que a insulina humana. Ela tem uma potência molar de aproximadamente 25% daquela da insulina humana em pacientes com diabetes e, por essa razão, ela é formulada em uma potência molar quatro vezes superior àquela da insulina

humana (RIDDLE; ROSENSTOCK; GERICH, 2003). A insulina detemir administrada uma ou duas vezes ao dia é pelo menos tão eficaz quanto a insulina NPH em manter o controle glicêmico global, com um risco similar ou inferior de hipoglicemia, especialmente hipoglicemia noturna, quando comparada com a insulina NPH em pacientes com DM-1 ou DM-2. Além disso, a insulina detemir tem o benefício adicional de não causar ganho de peso apreciável em pacientes com diabetes tipo 1 e causar menor ganho de peso do que a NPH em diabéticos tipo 2 (CHAPMAN; PERRY, 2004).

Os análogos de insulina de longa duração são utilizados como insulina basal, em uma ou duas doses diárias. Por serem bem mais previsíveis em sua ação do que a insulina NPH, tornam-se indicados para pacientes com diabetes tipo 1 (e tipo 2 em fases mais avançadas, insulino-pênicas) que apresentem oscilações importantes de suas glicemias diárias, com alternância de episódios de hipo e hiperglicemias, já que essas oscilações, além dos riscos inerentes associados, são importantes fatores de diminuição da qualidade de vida. Entretanto, com o surgimento das insulinas ultra-rápidas (lispro e aspart) pode-se, com vantagens, substituir a insulina regular por esses análogos (SBD, 2006a)

Os análogos de curta duração permitem uma boa aproximação dos perfis fisiológicos da secreção de insulina. Atualmente, existem três análogos de insulina de curta duração: a insulina lispro, a insulina asparte e a insulina glulisina.

A insulina lispro foi o primeiro análogo de insulina humana de curta duração desenvolvido, estando disponível no mercado sob a denominação Humalog. Após a injeção subcutânea, a insulina lispro é absorvida mais rapidamente do que a insulina humana regular e apresenta uma duração da ação mais curta. O pico de ação da lispro é significativamente maior e mais precoce do que o da insulina regular. Após a injeção subcutânea, a insulina lispro é absorvida mais rapidamente do que a insulina humana regular e apresenta uma duração da ação mais curta. O pico de ação da lispro é significativamente maior e mais precoce do que o da insulina regular. Quando injetada imediatamente antes das refeições, a lispro restringe as flutuações da glicemia pós-prandial de maneira mais intensa que a insulina regular aplicada 30 minutos antes da alimentação.

A insulina asparte foi o segundo análogo da insulina humana de curta duração disponível no mercado sob a denominação comercial de NovoRapid. A asparte, com relação à absorção, é semelhante a lispro, sendo absorvida duas vezes mais rápido e eliminada na metade do tempo quando comparada a insulina regular (SBD, 2006a)

Embora o controle glicêmico geral possa ou não ser diferente com a utilização dos análogos de curta duração, quando comparado com insulina regular (ANDERSON *et al.*,

1997), a administração adequada destes análogos permite uma maior flexibilidade, tanto para os adultos como para as crianças, que possuem uma alimentação irregular. Pois estes análogos podem ser aplicados imediatamente após as refeições, quando essa ingestão alimentar já foi bem quantificada. Os análogos de curta duração são efetivos na redução das oscilações das glicemias pós-prandiais, tanto do DM-1 como do DM-2 (PLANK *et al.*, 2002).

A insulina lispro não modificada é um análogo da insulina humana derivada de DNA recombinante, uma droga de ação rápida na redução da glicose no sangue. A insulina lispro modificada pela cristalização com protamina forma uma insulina de ação prolongada conhecida como *neutral protamine lispro* (NPL). Uma pré-mistura de insulina lispro não modificada (25%) + insulina lispro NPL (75%) caracteriza a formulação de um análogo bifásico, apresentando um pico de ação de início rápido e curta duração, com a atividade insulínica sendo mantida por até 24 horas graças ao componente NPL, cuja denominação comercial é Humalog Mix 75/25. Seu início de ação acontece em 15 a 30 minutos, sendo que o pico de ação ocorre entre 30 minutos e 2,5 horas.

Outro análogo bifásico com o mesmo conceito terapêutico é representado pela associação contendo 30% de insulina asparte solúvel (ação ultra-rápida) e 70% de insulina asparte protamina (ação intermediária), disponível sob a denominação comercial de NovoMix 30, a qual apresenta um início de ação entre 10 e 20 minutos, um pico de ação entre 1 e 4 horas e uma duração de ação de até 24 horas (SBD, 2006a).

Em pacientes com controle glicêmico estável e com necessidades insulínicas diárias razoavelmente constantes, sem necessidade de ajustes frequentes das doses e tipos de insulina, os análogos bifásicos podem ser uma opção de tratamento mais cômoda, principalmente para pacientes portadores de DM2, através de esquemas terapêuticos que incluem duas ou três aplicações por dia (GABBAY; DIB, 2006).

O uso de bombas de infusão de insulina tem se mostrado eficiente em crianças pré-escolares, escolares e em adolescentes. Num estudo de crianças de 1 a 6 anos de idade procurou-se avaliar, em 15 crianças, quanto era factível e o quanto havia de melhora nos controles glicêmicos com a bomba.. Em todos os pacientes, o uso de bomba melhorou a qualidade de vida e mostrou-se factível e seguro, levando os autores a considerarem essa modalidade terapêutica opcional para esse grupo de pacientes (HOLLANDER *et al.*, 2004).

Especialmente em crianças pequenas, há grande imprevisibilidade na quantidade de alimento ingerido em cada refeição, o que torna o uso de insulinas de ação rápida no pré-prandial motivo de preocupação sempre que a criança não consumir o que foi calculado para

aquela dose de insulina. Dessa forma, em algumas situações é mais seguro administrar-se insulina ultra-rápida após a refeição, quando já sabemos efetivamente o quanto a criança ingeriu.

Já são disponíveis dados sobre o uso de insulina inalada em adultos diabéticos, e não há diferença na hemoglobina glicada e nas excursões glicêmicas pós-prandiais quando em comparação com a insulina subcutânea. No entanto a cinética pulmonar da insulina inalada em seres humanos precisa ser mais bem conhecida. O uso em crianças não está ainda autorizado, de modo que devemos aguardar mais resultados com a administração em adultos para se ter a eventual perspectiva de se poder reduzir o número de injeções nas nossas crianças diabéticas, o que seria extremamente importante e muito facilitaria a aderência aos esquemas terapêuticos (STRACK, 2006).

A insulina inalável tem um perfil farmacocinético favorável que permite o seu uso imediatamente antes das refeições, da mesma forma que os análogos de insulina de ação curta. Evidências sobre a satisfação dos pacientes mostram que a insulina inalável tem maior aceitação (ROSENSTOCK *et al.*, 2004). Isso pode encorajar os pacientes para iniciar a insulina mais rapidamente, quando indicada pelos médicos ou ainda intensificar o tratamento com insulina para atingir o controle glicêmico adequado para prevenção das complicações mais efetivamente.

1.6.2 Os Hipoglicemiantes orais

São substâncias que, quando ingeridas, têm finalidade de baixar a glicemia e mantê-la normal (jejum $< 100\text{mg/dl}$ e pós-prandial $< 140\text{mg/dl}$) (OLIVEIRA; MILECH, 2004). Sob esse conceito amplo, de acordo com o mecanismo de ação principal, os antidiabéticos orais podem ser separados em: medicamentos que incrementam a secreção pancreática de insulina (sulfonilurêias e glinidas); reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases); diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); e/ou aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas), **Tabela 5**.

Os antidiabéticos orais podem ser classificados em duas categorias principais: os que aumentam a secreção de insulina (hipoglicemiantes) e os que não aumentam (anti-hiperglicemiantes).

Os agentes que aumentam a secreção de insulina são os secretagogos de insulina e compreendem as sulfonilurêias, que desenvolvem uma ação hipoglicemiante mais prolongada durante todo o dia (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e

glimepirida) e promovem queda de 1,5% a 2% na hemoglobina glicada; e as meglitinidas ou glinidas, com menor tempo de ação, cobrindo principalmente o período pós-prandial, com redução de hemoglobina glicada de 1% com a nateglinida e de 1,5% a 2% com a repaglinida (SBD, 2002, 2003; LEBOVITZ, 2004; MCCANCE *et al.*, 1994; UKPDS, 1998; ESPÓSITO *et al.*, 2004).

As sulfoniuréias estimulam a secreção de insulina ligando-se a um receptor específico na célula beta que determina fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP, resultando em despolarização da célula. Diminuem a glicose plasmática na ordem de 60mg/dl a 70mg/dl (Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002, SBD, 2006b). As sulfoniuréias ligam-se às subunidades SUR1 e bloqueiam o canal de K^+ sensível ao ATP. Por conseguinte tais fármacos se assemelham aos secretagogos fisiológicos (ex., glicose) que também diminuem a condutância desse canal. A redução da condutância do K^+ provoca despolarização da membrana e influxo de Ca^{2+} através dos canais de Ca^{2+} sensíveis a voltagem (DAVIS, 2006).

Os agentes que não aumentam a secreção de insulina são medicamentos que quando usados em monoterapia, em geral estão relacionados a um risco bem reduzido de hipoglicemia. Portanto, podem ser utilizados com segurança desde o início da enfermidade. Fazem parte desse grupo: acarbose (inibidor da alfa-glicosidase); metformina (biguanida); rosiglitazona e pioglitazona (tiazolidinedionas ou glitazonas). A acarbose reduz a velocidade de absorção intestinal de glicose; age, portanto, numa fase mais precoce, ainda no tubo digestivo, predominantemente na glicemia pós-prandial (SBD, 2002, 2006b; LEBOVITZ, 2004; OLIVEIRA; MONTEIRO; ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA; MILECH, 2004).

A metformina tem sua maior ação antihiper-glicemiante diminuindo a produção hepática de glicose, acompanhada de ação sensibilizadora periférica mais discreta. Em média, a metformina reduz a hemoglobina glicada em 1,5% a 2% (SBD, 2002, 2006b; LEBOVITZ, 2004; OLIVEIRA; MONTEIRO; ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA; MILECH, 2004; CUSI; DEFRONZO, 1998; UKPDS, 1998). A metformina, quando associada a sulfoniluréias, determina um efeito hipoglicemiante aditivo. Não está associada a aumento de peso, podendo, inclusive, determinar uma diminuição de dois a três quilos durante os primeiros seis meses de tratamento (SBD, 2002, 2006b).

A metformina não provoca a liberação de insulina a partir do pâncreas e, em geral, não causa hipoglicemia mesmo em grandes doses. O fármaco reduz os níveis de glicose primariamente por diminuir a produção hepática de glicose e aumentar a ação de insulina no músculo e tecido adiposo. Em nível molecular, essas ações são mediadas pelo menos em

parte, pela ativação da cinase celular, a proteinocinase ativada por AMP (AMP cinase). O mecanismo pelo qual a metformina diminui a produção hepática de glicose é controverso, porém a maioria dos dados indica um efeito sobre a redução da gliconeogênese. A metformina também pode diminuir a glicose plasmática por reduzir a absorção intestinal de glicose; todavia, não foi constatado que tal ação tenha importância clínica (DAVIS, 2006)

As glitazonas atuam predominantemente na insulinoresistência periférica em nível de músculo, adipócito e hepatócito, sensibilizando a ação da insulina produzida pelo próprio paciente. Em teoria, como melhoram a *performance* da insulina endógena, sem necessariamente aumentar sua secreção, as glitazonas teriam o potencial de preservar a célula beta e de postergar a deterioração cardiovascular (embora tais evidências ainda careçam de estudos com grandes amostras). As glitazonas reduzem a hemoglobina glicada em 1% a 2,2%, em média (LEBOVITZ, 2004; OLIVEIRA; MONTEIRO; ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA; MILECH, 2004; KOSHIYAMA *et al.*, 2001; PARULKAR *et al.*, 2001; TIIKKAINEN *et al.*, 2004; YU *et al.*, 1999; SBD, 2006b; WYNE *et al.*, 2004).

A escolha do medicamento deve levar em conta: os valores das glicemias de jejum e pós-prandial e da hemoglobina glicada; o peso e idade do paciente; a presença de complicações, outros transtornos metabólicos e doenças associadas; as possíveis interações com outros medicamentos, reações adversas e as contra-indicações (SBD, 2006b).

Tabela 5 – Tratamento do DM2 com agentes antidiabéticos

Medicamentos (mg)	Mecanismo de ação	Redução da Glicemia de jejum (mg/dL)	Efeitos colaterais
SULFONIURÉIAS			
Clorpropamida 125 a 500	Aumento da secreção de insulina	60-70	Hipoglicemia e ganho ponderal (clorpropamida favorece o aumento da pressão arterial e não protege contra a retinopatia)
Glibenclamida 2,5 a 20			
Glipizida 2,5 a 20			
Glicazida 40 a 320			
Glimepirida 1 a 8			
METIGLINIDAS			
Rapaglinida 0,5 a 16	Aumento da secreção de insulina	20-30	Hipoglicemia e ganho ponderal discreto
Nateglinida 120 a 360			
BIGUANIDAS			
Metformina 1.000 a 2.550	Reduz a produção hepática de glicose com menor ação sensibilizadora da ação insulínica	60-70	Desconforto abdominal, diarreia
INIBIDORES DA ALFAGLICOSIDASE			
Acarbose 50 a 300	Retardo da absorção de carboidratos	20-30	Meteorismo, flatulência e diarreia
GLITAZONAS			
Rosiglitazonas 4 a 8	Aumento da sensibilidade à insulina em músculo, adipócito e hepatócito (sensibilizadores da insulina)	35-65	Edema, anemia e ganho ponderal
Pioglitazona 15 a 45			

Fonte: Sociedade Brasileira de Diabetes (2006b)

Um dos mais recentes medicamentos disponíveis no País é o glucovance, lançado pela Merck Brasil. Ao reunir, num só comprimido, duas substâncias já amplamente utilizadas para o controle da doença, a metformina e a glibenclamida, Glucovance passou em pouco tempo a ser o segundo antidiabético oral mais prescrito pelos endocrinologistas.

O sucesso do lançamento, tanto no Brasil como nos Estados Unidos, onde glucovance recebeu em 2003 mais de 20 milhões de prescrições, deve-se à sua eficácia na redução das glicemias e ao seu custo mais acessível.

Por se tratar de uma doença crônica, a relação custo/benefício é levada em conta por médicos e pacientes na escolha de uma terapia. Além disso, o diabetes geralmente está associado a outras doenças como colesterol elevado ou hipertensão, o que obriga os pacientes a usarem vários medicamentos simultaneamente, processo conhecido como polifarmácia. Ao unir duas substâncias em uma, glucovance reduz significativamente o número de comprimidos ingeridos diariamente por estes pacientes (PERGUNTAS e respostas-Glucovance, portal diabetes, 2006).

Um estudo desenvolvido no Brasil com a droga pela Dra. Marília Brito Gomes, professora doutora da Disciplina de Diabetes e Metabologia da UERJ, e equipe, envolvendo 733 pacientes portadores de diabetes tipo 2, indicou que o grupo que utilizou Glucovance apresentou menores índices de glicemia de jejum, glicemia pós-prandial (após as refeições) e glicemia capilar.

“O novo medicamento tem se mostrado bastante eficaz no tratamento do diabetes, ao combinar duas drogas que atuam em sinergia no organismo, promovendo uma queda significativa nos níveis de glicemia. Na medida em que se apresentam soluções eficientes e mais econômicas, o trabalho do médico é facilitado na hora da prescrição e observa-se uma melhora da adesão dos pacientes ao tratamento”, comenta a Dra. Marília (NOVO medicamento para diabetes, 2007)

Pesquisas realizadas no Exterior confirmam a adesão dos pacientes ao tratamento com Glucovance. O estudo Melikian acompanhou um grupo de portadores de diabetes. Os que utilizavam as duas substâncias isoladamente apresentaram uma adesão de 54% contra um índice de 77% de adesão para os que usaram o Glucovance (NOVO medicamento para diabetes, 2007).

1.7 Justificativa e objetivos

1.7.1 Justificativa

Plantas do gênero *Cissus* tem sido usada na medicina popular para gripe e problemas respiratórios (BRAGA, 1985), dor e inflamação (GARCIA *et al.*, 2000; SINGH *et al.*, 1984, PUERTA, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2002; QUILEZ *et al.*, 2004) úlcera gástrica (JAINU; DEVI, 2004), epilepsia, hipertensão febre, reumatismo e diabetes (SILVA, 1995).

Embora *Cissus verticilata*, syn *Cissus sycioides* seja usada na medicina popular como antidiabético, poucos estudos tem sido feito para confirmar o potencial antidiabético da planta (MORI *et al.*, 2001; BELTRAME *et al.*, 2001; PEPATO *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2004). Destes estudos, somente Beltrame *et al.* (2001), estudou o chá e seus constituintes ativos, entretanto não confirmou o potencial antidiabético da planta.

Estudos em nosso laboratório (SALES *et al.*, 2004; LINO *et al.*, 2005) demonstraram que a Fração solúvel em Metanol de *Cissus verticilata* em animais tratados por 5 dias possui atividade hipoglicemiante e hipolipemiante.

Com o objetivo de estudar os constituintes ativos da planta, seu perfil fitoquímico foi analisado e detectado a presença de taninos e flavonóides (VIANA *et al.*, 2004). A fração solúvel em metanol da planta também foi analisada, e da mesma foi isolada pela primeira vez a tiramina no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará (ALEXANDRE, 2006)

Como referido na introdução deste trabalho a tiramina tem sido estudada e confirmada como substância com atividade hipoglicemiante em estudos experimentais em ratos, sugerida para o tratamento do diabetes. Partindo deste pressuposto o nosso estudo visa estudar o potencial antidiabético de *Cissus verticilata*, bem como seu mecanismo de ação, enfatizando seu constituinte principal que é a tiramina.

1.7.2 Objetivo Geral

Investigar a ação hipoglicemiante da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), isolados de *Cissus verticillata* bem como suas atividades antioxidante, antinociceptiva e antiinflamatória.

1.7.3 Objetivos Específicos

- Investigar a ocorrência de atividade hipoglicêmica da FSM e TIR em ratos normais;
- Avaliar a atividade hipoglicêmica e hipolipemiante da FSM, FRT, TIR, Glibenclamida (GLI) e Metformina (MET) e as associações (FSM + TIR; GLI + TIR E MET + TIR) em ratos diabéticos induzidos por Aloxano;
- Dosar os níveis séricos de uréia e creatinina, bem com as enzimas Aspartato transaminase (AST) e Alanina transaminase (ALT) em ratos diabéticos tratados com da FSM, FRT ,TIR , GLI e as associações (FSM + TIR; GLI + TIR E MET + TIR);
- Realizar estudo histopatológico do pâncreas de ratos diabéticos tratados com a FSM e TIR e GLI;
- Determinar os efeitos da FSM, TIR e GLI na hiperglicemia induzida por diazóxido (DZ);
- Determinar o conteúdo de glicogênio hepático de ratos diabéticos tratados com a FSM;
- Estudar a atividade antioxidante : TBARS, Catalase e Glutathione e nitrito/nitrato em fígado de ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI;
- Determinar a Hemoglobina glicada em ratos não diabéticos tratados com FSM e TIR;
- Determinar o peso e mortalidade dos ratos tratados diabéticos após tratamento com FSM, FRT, TIR, GLI e MET;
- Investigar a atividade analgésica no teste da formalina em animais tratados com a FSM, TIR e GLI;
- Avaliar a atividade antiinflamatória da FSM, TIR e GLI nos modelos de inflamação aguda, tais como edema induzido por carragenina e dextrano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Material botânico

As folhas de *Cissus verticillata* foram coletadas no Horto de plantas Medicinais Prof. Francisco de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará. A exsicata da planta está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará sob o número 32240.

2.1.2 Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Fração Rica em Tiramina (FRT) de *Cissus verticillata*

A Fração Solúvel em Metanol e a Fração Rica em Tiramina foram preparadas a partir das folhas de *Cissus verticillata* e gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa em Química Orgânica, Departamento de Química Orgânica da UFC, coordenado pelo Prof.Dr. Edilberto Silveira.

2.1.3 Tiramina comercial

A tiramina (cloridrato de tiramina) foi obtida da Sigma Chemical Co (St.Louis,MO,USA), e solubilizada em água destilada para utilização em todos os experimentos.

2.1.4 Animais

Os experimentos foram realizados utilizando-se ratos albinos (*Rattus norvegicus*) variedade Wistar (150 a 250 g), machos, camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss-webster (25 a 30 g) de ambos os sexos, provenientes do Biotério Central da

Universidade Federal do Ceará e trazidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina desta mesma Universidade . Os animais foram divididos em grupos e mantidos aproximadamente durante uma semana no Biotério de Departamento de Fisiologia e Farmacologia em períodos de claro/escuro de 12 horas para ambientação e aclimação. Aos animais foi fornecidas água e ração *ad libitum*.

2.1.5 Drogas

Aloxano, carragenina, dextrano, indometacina, bicarbonato de sódio, ciproheptadina, glicogênio, amiloglicosidase, glicogênio, citrato de sódio, fluoreto de sódio, etilenodiaminotetracético (EDTA), cloridrato de tiramina, diazóxido, pentobarbital e Tween 80 foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St.Louis,MO,USA), Glicose (Reagen), Glibenclamida do Laboratório Teuto Brasileiro LTDA, (GO, Brasil), morfina (Roche), Metformina (Merck), Éter, Ácido tricloroacético, Ácido tiobarbitúrico, 5,5'-dithiobis (2-dinitrobenzoic acid) (DTNB) foram adquiridos da Merck. Todas as drogas foram dissolvidas em água destilada com exceção do diazóxido que foi preparado com Tween 80 a 1 %.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção da FSM

Amostras de 300g de folhas frescas de *Cissus verticilata* foram submetidas à decocção, por cinco minutos, em 500 mL de H₂O destilada. A solução foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada. As mesmas folhas foram submetidas ao mesmo processo perfazendo um total de 1 litro de decocto. Foram obtidos 4 litros de decocto a partir de 4 amostras num total de 1,2 kg.

As quatro soluções foram liofilizadas fornecendo um total de 29,48 g de material sólido marrom.

O sólido resultante foi agitado durante 30 minutos em 100 mL de metanol, à temperatura ambiente. Depois de filtrado o resíduo sólido foi novamente agitado em 50 mL de metanol por mais trinta minutos e filtrado, repetindo-se o processo por mais duas vezes. Após evaporação do solvente foram obtidos 15,67 g de um resíduo pastoso marrom escuro

que foi denominado Fração Solúvel em Metanol (FSM) e 11,35 g de um resíduo sólido insolúvel em metanol que foi denominado Fração Insolúvel em Metanol (FIM).

Os testes iniciais apresentaram resultados muito significativos para a fração solúvel em metanol (FSM) e motivaram a continuidade dos trabalhos com esta fração.

2.2.2 Obtenção da FRT e da TIR

5,08g da FSM dissolvidos em 8 mL de metanol (MeOH) foram cromatografados em coluna de Sephadex LH-20 (100g) de 5 cm de diâmetro, por eluição com MeOH.

Foram coletadas 24 frações de 9 mL, mais três frações de 125, 250 e 500 mL respectivamente. 500 mL de uma última fração foi coletada tendo como eluente MeOH:H₂O (1:1).

Comparação por cromatografia de camada delgada (CCD) e revelação sob luz UV permitiu a reunião das frações semelhantes (F:1-3; 3-4; 4-7; 8-12; 13-19; 19-24; 25;26;27 e 28).

A fração FSM-F₁₉₋₂₄F₆₋₈ (1,0073g) foi analisada por ressonância magnética nucleática (RMN) de ¹H revelando a presença de tiramina, sendo denominada de Fração Rica em Tiramina (FRT).

Esta fração foi recromatografada em coluna de Sephadex LH-20 (25g) de 3 cm de diâmetro, por eluição em MeOH. Foram coletadas 12 frações de 9,00 mL.

A fração FSM-F₁₉₋₂₄F₆₋₈ (0,7524g) foi dissolvida em 8mL de MeOH, acrescentando-se lentamente em seguida 60 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um precipitado branco, que por filtração foi separado do líquido mãe.

Para melhor purificação do precipitado, este foi redissolvido em 5 mL de MeOH e novamente acrescentou-se lentamente 35 mL de acetato de etila, ocorrendo a formação de um precipitado branco (0,34 mg).

O líquido mãe inicial foi colocado em repouso durante à noite, sob refrigeração, formando um precipitado branco que, depois de filtrado, resultou em 0,050g.

Os dois precipitados obtidos, denominados SM-1, foram analisados por RMN de ¹H e ¹³C permitindo a identificação dos mesmos como tiramina.

2.2.3 Atividade hipoglicemiante no Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM e Glibenclamida (GLI)

Ratos machos Wistar divididos em cinco grupo da seguinte maneira: controle normal (CN), n=8; controle hiperglicêmico (CH),n=8; FSM (50 e 100mg/kg,), n=8; GLI (5mg/kg), n=8. A administração oral da sobrecarga de glicose 3 g/kg nos animais dos grupos citados foi feita 30 min após o tratamento com drogas, respectivamente (KUMARI & AUGUSTI, 1994, sendo que o grupo CN foi tratado apenas com água destilada (WANG *et al.*, 1996). As amostras de sangue foram coletadas da veia caudal dos animais, sob leve anestesia com éter, nos tempos 0 (antes) e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. A glicemia foi medida em fitas através de glicosímetro (ultra one-touch). Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas antes do início do protocolo experimental .

2.2.4 Atividade hipoglicemiante em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM, TIR e GLI

Ratos Wistar, machos (150-250g) foram divididos em 5 grupos que, ficaram em jejum de 12 horas e em seguida foi verificado a glicemia antes do tratamento. Os animais foram tratados por via oral, uma vez ao dia, durante 5 dias com FSM (100 mg/kg), n=14; TIR (2 e 4 mg/kg), n=8; GLI (5 mg/kg), n=13 e água destilada (Controle Normal= CN), n=8. No 5º dia, 1 h após o último tratamento, sob leve anestesia com éter, o sangue dos animais em jejum foi colhido da veia calda e a glicemia dosada em glicosímetro (ultra one-touch)

2.2.5 Avaliação de peso, mortalidade em ratos induzidos com Aloxano (ALX)

Ratos machos pesando entre 150-200g ficaram em jejum de 12 horas e em seguida foram divididos em três grupos e injetados com aloxano (40, 50 e 60mg/kg,i.v.), n= 50, 26 e 58, respectivamente na veia peniana. O sangue foi coletado através do plexo orbital 48 horas e 5 dias após a administração do aloxano, sob leve anestesia pelo éter. Os animais que mostraram glicemia ≥ 200 mg/dL foram avaliados quanto a variação de peso e taxa de mortalidade. As dosagens da glicose no sangue foram realizadas de acordo com a orientação do fabricante- Labtest diagnostica.

2.2.6 Curva glicêmica com ALX

Ratos machos pesando entre 150-200g ficaram em jejum de 12 horas e em seguida foram injetados com ALX 40 mg/kg,i.v, na veia peniana, n=13. O sangue foi coletado através do plexo orbital 24, 48 horas e 5 dias após a administração do aloxano, sob leve anestesia pelo éter. Os animais que mostraram glicemia ≥ 200 mg/dL foram incluídos e avaliados quanto a variação da glicemia durante o período de tratamento.

2.2.7 Atividade hipoglicemiante no TOTG em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI

Ratos machos Wistar divididos em 9 grupos foram divididos da seguinte maneira: controle normal (CN),n=8; controle diabético (CD), n=7; FSM (50 e 100mg/kg), n=6; GLI (5mg/kg), n=6; FRT (100 mg/kg), n=6; TIR (1 e 2 mg/kg), n=7. A hiperglicemia foi induzida com ALX 40 (mg/kg,i.v.) e 48 horas depois, sob leve anestesia com éter o sangue foi colhido do plexo orbital, conforme protocolo já citado anteriormente. Em seguida, os animais com glicemia ≥ 200 mg/dL foram tratados com uma sobrecarga de glicose 3 g/kg, v.o., 30 min após o tratamento com as drogas, respectivamente (KUMARI; AUGUSTI, 1994), sendo que o grupo CN foi tratado apenas com água destilada (WANG *et al.*, 1996). As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital em tubos de ensaio contendo anticoagulante nos tempos 0 (antes) e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Em seguida o sangue foi submetido a centrifugação a 3000 rpm,por 10 minutos, obtendo-se amostras de plasma nos quais foram feitas dosagens da glicose pelo método da glicose- oxidase (labtest).

2.2.8 Avaliação da glicemia, triglicerídeos, colesterol total e frações; níveis séricos de uréia, creatinina e dosagem das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminas (ALT), em ratos diabéticos tratdos com a FSM, FRT, TIR e GLI e Metformina (MET)

Grupos de 6-8 ratos Wistar, machos, pesando entre 150-250 g foram utilizados, e divididos em CN, CD, FSM nas doses de 50 e 100 mg/kg, GLI (2,5 e 5 mg/kg), FRT (100

mg/kg), TIR (1, 2 e 4 mg/kg), Metformina (MET 50 e 100 mg/kg) e as associações: FSM 50 + TIR 1; GLI 5 + TIR 1; MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2, respectivamente. Os animais foram mantidos em jejum de 12 horas antes do início do protocolo experimental (KUMARI & AUGUSTI, 1996). Os animais, exceto o grupo CN, foram injetados com aloxano 40 mg/kg, na veia peniana e 48h após, sob leve anestesia com éter, foi coletado amostras de sangue do plexo orbital em tubos de ensaio contendo gel de separação. Foram incluídos no experimento somente os animais com glicemia ≥ 200 mg/dL. Os grupos CN e CD receberam apenas água destilada (10 mL/kg, v.o.) e os demais grupos já citados foram tratados por 5 dias, uma vez ao dia. Decorrido este período, uma hora após o último dia de tratamento, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de cada animal em tubos de ensaio à vácuo contendo gel de separação, e em seguida o sangue foi submetido à centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, obtendo-se amostras de soro nos quais foram feitas análises bioquímicas da glicose, triglicerídios (TG), colesterol total (CT), Lipoproteína de Alta Densidade (HDL), e Lipoproteína de Muito Baixa Densidade (VLDL), uréia e creatinina e das enzimas Aspartato transaminase (AST), Alanina transaminase (ALT).

Avaliação dos parâmetros bioquímicos: Para análise da glicose foi utilizado o método enzimático da glicose oxidase enquanto que as análises de TG, CT, HDL e VLDL foram realizadas pelo método enzimático de Trinder

GLICOSE - A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose para ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (antipirilquinonimina), cuja absorvância é medida em 505nm e a intensidade da cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

TRIGLICERÍDIOS - Os triglicerídios são hidrolisados pela lipase lipoprotéica e o glicerol liberado é fosforilado pelo glicerol quinase formando glicerol fosfato que é oxidado a dihidroxiacetona e água oxigenada por ação da glicerol-3-fosfato oxidase. Através da reação de copulação oxidativa catalisada pela POD, a água oxigenada reage com a 4-aminoantipirina e ESPAS, produzindo a antipirilquinonimina, cuja absorvância, medida em 540 nm, é diretamente proporcional à concentração de triglicerídios.

COLESTEROL TOTAL - Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase formando colesterol livre que após oxidação pela colesterol oxidase forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela POD, produz uma quinonimina de cor vermelha, cuja absorvância, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

COLESTEROL HDL - As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os quilomícrons são quantitativamente precipitados com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado as lipoproteínas de alta densidade (HDL) é determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático.

COLESTEROL VLDL - Sabemos que as VLDL são ricas em triglicerídios e parecem-se aos quilomícrons, porém são partículas bem menores. A proporção de colesterol/triglicerídios nesta lipoproteína é de 1:5. No paciente em jejum os triglicerídios do plasma são transportados pelas VLDL, assim se dividirmos o valor dos triglicerídios encontrados por 5, já que a proporção é de 1:5, teremos o valor do colesterol das VLDL.

▪ **Cálculo:**

$$\text{VLDL} = \frac{\text{Triglicerídios}}{5}$$

5

Uréia - A uréia é hidrolisada pela urease à íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar azul de indofenol. A intensidade de cor formada é proporcional a quantidade de uréia na amostra. O método utiliza a técnica manual e é facilmente aplicável em analisadores semi-automáticos e automáticos capazes de pipetar dois reagentes e medir com exatidão a absorvância entre 580 e 620 nm. O método utilizado foi o da Urease-Labtest.

Creatinina - A creatinina e outros componentes do soro reagem com a solução de picrato em meio alcalino formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente. A adição de um acidificante abaixa o pH para 5,0, promovendo a decomposição do picrato de creatinina, permanecendo inalterada a cor derivada dos cromogênios, que também é

medida fotometricamente. A diferença entre as duas leituras fornece o valor da creatinina verdadeira. A absorvância é medida entre 500-540 nm.

Alanina Transaminase (ALT) - É uma enzima produzida pelo fígado e liberada no sangue quando ocorre lesão das células hepáticas. Portanto a mensuração da alanina transaminase ou alanina glutâmica pirúvica (ALT/TGP) no sangue é útil para detecção de lesão celular hepática.

A ALT catalisa especificamente a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. O piruvato é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340 ou 365 nm conseqüente a oxidação da NADH é monitorizada espectrofotometricamente, sendo diretamente proporcional a atividade da ALT na amostra. Procedimento: no ensaio em 1 ml do reagente foi adicionado 0,1 ml da amostra. Após homogeneização a amostra foi transferida para uma cubeta termostatisada a 30° C e deixada em repouso durante 1 min. Decorrido esse período foi realizada a leitura inicial (A₁) a qual foi repetida após 2 min (A₂). A medida das diferenças de absorvância por minuto ($\Delta A/\text{min}$) foi determinada, e utilizada para calcular o resultado. $\text{ALT (U/L) } 340 \text{ nm} = \Delta A/\text{min} \times 1476$.

Aspartato Transaminase (AST) - É uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática, cardíaca, muscular ou cerebral. Assim a determinação da aspartato transaminase ou transaminase glutâmico oxalacética (AST/TGO) em amostras de sangue é útil na avaliação da função hepática.

A AST catalisa a transferência dos grupos amina da alanina para o cetoglutarato com formação de glutarato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a enzima NADPH é oxidada a NAD. A redução da absorvância em 340 nm ou 365 nm, determinada por espectrofotometria é diretamente proporcional à atividade da enzima na amostra.

Procedimento: foi realizado de acordo com o procedimento citado no item anterior, empregando-se o reagente de trabalho adequado para a mensuração da AST.

$\text{AST/TGO (U/L) } 340 \text{ nm} = \Delta A/\text{min} \times 1476$.

2.2.9 Estudo da Atividade Antioxidante

Ratos Wistar (180-200g) após 5 dias de tratamento foram mortos por deslocamento cervical e o fígado foi removido imediatamente e homogeneizado em uma solução de KCL 1.15% em um volume equivalente a 10 vezes o peso do fígado., ou seja cada 1 g foi homogeneizado em 10 ml da solução. O sobrenadante foi retirado e utilizado para dosagem de TBARS, Catalase, Glutathiona reduzida e Nitrito.

2.2.9.1 Medida dos níveis de lipoperoxidação no tecido hepático – Dosagem de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HUONG *et al.*, 1998).

Ao homogenato do fígado (0,5 ml) a 10 % em KCL a 1,15 % foi adicionado 0,9 ml de tampão fosfato de sódio monobásio (50mM, pH= 7,4) e 0,5 ml do sistema catalisador de formação de radicais livres contendo FeSO₄ (0,01mM) e ácido ascórbico (0,1mM). A mistura foi mantida durante 30 min a 37°C e a seguir a reação será interrompida pela adição de 1 ml de ácido tricloroacético a 10 %. A seguir após centrifugação (3000 rpm -15 min), o sobrenadante foi separado e acrescido 1 ml de ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi mantida em banho de água fervente durante 15 min. Após resfriamento com o auxílio de um banho de gelo, foi medida a absorvância em 532 nm utilizando um espectrofotômetro. Os dados foram calculados a partir de uma curva padrão de malonildialdeído (MDA), um dos produtos tóxicos da peroxidação lipídica, expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

2.2.9.2 Dosagem de Glutathiona Reduzida (GSH) – determinação de grupos sulfidrílicos (-SH) não-proteicos.

A GSH (L-γ-Glutamil-L-cisteinil-glicina é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular e constitui um dos agentes mais importante dos sistemas de defesa antioxidante de defesa da célula (MEISTER; ANDERSON, 1983).

O nível de GSH foi determinado a partir do método de Ellman (1959) modificado. Para tanto, ao homogenato do fígado (400 µL) a 10 % em EDTA 0,02 M foi acrescido 320 µL e 80µL de ácido tricloroacético a 50 %. Após centrifugação, 3000 rpm durante 15 min a 4°C, foi retirada uma aliquota do sobrenadante (400 µL) e acrescido Tris-HCL 0,4 M, PH 8,9 (800 µL) e DTNB 0,01 M (20 µL). A leitura espectrofotométrica (420

nm) foi realizada 1 min após a adição do DTNB . Os dados foram calculados a partir de uma curva padrão de GSH e expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido.

2.2.9.3 Determinação da atividade da catalase no fígado (AEBI, 1984).

O tecido hepático foi homogeneizado em um volume 200 vezes o seu peso com solução tampão fosfato de sódio 0,1 M- PH 7,0. A seguir o homogenato foi centrifugado a 4°C durante 10 min a 5800 rpm; a fase superior foi desprezada enquanto a fase inferior foi submetida a análise espectrofotométrica (230 nm). Na cubeta foi adicionado 980 μL do meio de reação (H_2O_2 15 %, Tampão Tris-HCL 1 M: EDTA 5 mM PH 8,0; H_2O milli-Q, 20 μL da amostra diluída (Amostra- Tampão (1:200)) e logo a seguir foi determinada a absorbância em espectrofotômetro (532 nm), durante 6 min. Os resultados foram expressos em mmol/minuto/mg de proteína.

2.2.9.4 Determinação do conteúdo de nitrito/nitrato (GREEN *et al.*,1981).

O reativo de Gries (N-1-naftiletilenodiamina) a 0,1% em água, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorbância em 560nm.

O sobrenadante dos homogenatos (centrifugado) de fígado foi coletado e a produção de nitrito/nitrato foi determinada baseada na reação de Griess. Rapidamente, 100 μl do sobrenadante foi incubado com 100 μl do reagente de Griess a temperatura ambiente por 10 min. Para o branco foram usados 100 μL do reagente de Griess adicionados 100 μL de salina. A absorbância foi medida a 560 nm em leitor de microplaca. A concentração de nitrito foi determinada de uma curva padrão formada pelo uso de NaNO_2 .

2.2.9.5 Determinação do conteúdo Proteína (Método de LOWRY *et al.*, 1951).

Foi utilizada a metodologia descrita por Lowry *et al.* (1951). A reação consiste na hidrólise alcalina das proteínas com posterior reação com o reagente colorimétrico de Folin-Ciocalteu em uma solução contendo Na_2CO_3 200 mM, NaOH 100 mM, tartarato de sódio e potássio 1 mM e sulfato de cobre 20 mM. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 750 nM e os valores obtidos comparados com a curva padrão de albumina.

2.2.10 Estudo Histopatológico em pâncreas de ratos diabéticos

No quinto dia de tratamento os animais utilizados no experimento de atividade hipoglicemiante foram sacrificados sob leve anestesia com éter. O pâncreas foi dissecado, lavado com soro fisiológico e em seguida colocado em formol aquoso neutro a 10 %, desidratado com uma seqüência de soluções aquosas contendo etanol 50-100 % e incluído em parafina de acordo com os métodos laboratoriais de rotina. Cortes em seções de 5 μm foram corados com hematoxilina-eosina e observados com o auxílio do microscópio ótico.

2.2.11 Atividade hipoglicemiante da FSM, TIR e GLI na hiperglicemia induzida por diazóxido

Os ensaios foram realizados de acordo com estudos anteriores (LEAHY *et al.*, 1994; GRAY; FLATT, 1999; ZHAO *et al.*, 2005).

Grupos de seis ratos Wistar, machos, pesando entre 150-250 g ,em jejum de 12 foram utilizados, e divididos em Controle normal (CN), FSM (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), TIR (2 mg/kg), Diazóxido 60 mg/kg (DZ 60), e as associações: FSM 100 + DZ 60; GLI 5 + DZ 60; TIR 2 + DZ 60, respectivamente. Na primeira etapa do exepimento os animais foram tratados por via oral com a FSM (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), TIR (2 mg/kg) e DZ (60 mg/kg,i.p.) e 1 hora ou 30 minutos depois o sangue dos animais foi colhido para avaliação da glicemia nos tempos 0 (antes) e 30, 60, e 120 minutos após a administração das respectivas drogas citadas. Em uma outra etapa os animais foram tratados com a FSM (100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), TIR (2 mg/kg) e 30 minutos depois foram injetados com DZ (60

mg/kg). As amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de cada animal em tubos de ensaio à vácuo contendo gel de separação, 0 (antes) e 30, 60, e 120 minutos após a administração de DZ (60 mg/kg,i.p.). Em seguida o sangue foi submetido a centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos, obtendo-se amostras de plasma nos quais foram feitas dosagens da glicose pelo método da glicose- oxidase (labtest).

2.2.12 Determinação do conteúdo de glicogênio pelo método de Murat e Serfaty (1974).

Ratos Wistar, Machos (150-200 g) diabéticos induzidos com ALX 40 mg/kg,i.v. foram tratados com A FSM (100 mg/kg,v.o) ou água destilada (controle diabético = CD), durante 10 dias. Os animais controle normal (CN) foram tratados apenas com água destilada. No décimo dia, 1 hora após o último tratamento os animais foram anestesiados com éter e o fígado foi dissecado, lavado com soro fisiológico a 0,9 % e as amostras do mesmo foram retiradas e pesadas.

Em seguida, as amostras do fígado foram homogeneizadas em um homogeneizador (Modelo Polytron 9600) em tampão citrato de Sódio (0.1mol/litro , pH 4.2). O baixo pH e adição de Fluoreto de Sódio (250mg/dL) faz a quebra da glicose livre pelo tecido. Imediatamente após a homogeneização, 10µl da mistura foi usada para determinar a glicose livre no tecido.

No ensaio utilizamos 100mg de fígado em 10ml de tampão citrato. Cerca de 1 mg de amiloglicosidase foi adicionada por mililitro de tampão em cada ensaio. A amiloglicosidade em pó foi então misturada com o homogenato, tendo ficado à temperatura ambiente por no mínimo 2h, até 24 h. Uma amostra de 10µl foi então usada para determinar o valor total da glicose. O valor da glicose livre inicial é subtraído, sendo a diferença o valor usado para calcular o conteúdo de glicogênio do tecido.

2.2.13 Avaliação da glicação da Hemoglobina *in vitro* (ASGARY *et al.*, 1999)

Ratos Wistar, machos, n=6, não diabéticos (250-300g) em jejum de 12h foram anestesiados com tiopental e em seguida coletados 3mL de sangue da aorta abdominal de cada rato e distribuídos em tubos com 1gota de EDTA (10g/dL). Os tubos foram centrifugados a 3000 rpm 5min para remoção do sobrenadante.

As células foram filtradas num tecido de cotton, e lavadas com NaCl 0,15M na proporção de 1:10 por 03 vezes, centrifugando-as a 3000 rpm, 5min a cada lavagem. Lavou-se a suspensão mais duas vezes com NaCl 0,15M (1:10), centrifugando-se a cada lavagem a 3000 rpm, 5min e desprezando o sobrenadante. Transferiu-se a suspensão de células para um tubo plástico graduado e acrescentou-se tampão fosfato 0,01M, pH=7,4 contendo gentamicina 20mg/dL e CCL₄ na seguinte proporção: suspensão: 1 volume, Tampão: 2 volumes e CCL₄: 0,5 volume. Centrifugou-se a 3000 rpm, 5min e recolheu-se o sobrenadante contendo a Hb total.

Determinou-se a HB pelo método LABTEST (5mL do reagente de cor (ferrocianeto de potássio 60,7 mmol/L e cianeto de potássio 76,8 mmol/L) mais 20µL do hemolisado. Após 5 min, foi lido em espectrofotômetro a 540nm, zerando o aparelho com água destilada. Após determinação do conteúdo de hemoglobina, a preparação foi diluída em tampão fosfato 0,01M, pH=7,4 para obtenção de uma solução contendo 8g/dL de Hb.

Incubou-se tubos **controles** contendo 1mL da solução de hemoglobina 8g/dL (a concentração final no tubo foi de 4g/dL), gentamicina 20mg/dL e 1mL do tampão fosfato 0,01M, pH=7,4 contendo D-glicose 50mM. Os tubos **testes** foram incubados nas mesmas condições e continham também FSM (50µg/mL) ou Quercetina (50µg/mL) ou tiramina (50µg/mL). Os tubos foram incubados por 48h, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram tratadas com ácido bórico 1M para remoção da fração instável da Hemoglobina glicada (Hbpré-A_{1C}). As amostras foram submetidas à cromatografia de troca iônica para a determinação da Hemoglobina glicada (Metodologia da LABTEST).

2.2.14 Atividade Analgésica da FSM. TIR, GLI e morfina (MOR) no teste da formalina

O teste da formalina foi baseado no método de Dubuisson e Dennis (1977) modificado por Hunskaar e Hole (1985). Camundongos Swiss, machos (25-30 g) foram tratados por via oral com a FSM (50 e 100 mg/kg), GLI (5 mg/kg), TIR (1,2 and 4 mg/kg.), MOR (10 mg/kg) e FSM 50 + TIR 1 mg/kg e veículo (0,1 ml/10 g de água destilada). Uma hora ou 30 minutos depois os animais foram injetados na pata traseira direita com 20µl de formalina a 1%. Logo após iniciou-se a observação da reação à dor, cronometrando-se o tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata durante a

primeira fase (0-5 min), dor neurogênica, e a segunda fase (20-25 min), dor inflamatória relacionada a liberação de mediadores químicos).

2.2.15 Edema de pata induzido por carragenina em camundongos e ratos

Descrito por Winter *et al.* (1962) o edema inflamatório induzido pela injeção subcutânea de carragenina na pata é resultante da ação seqüencial e integrada de vários mediadores inflamatórios que causam um aumento agudo e progressivo do volume da pata. Assim esse modelo tem sido considerado útil para avaliação da atividade antiinflamatória de vários compostos.

Camundongos Swiss, machos (25-30 g) foram tratados por via oral com a FSM (50 e 100 mg/kg), TIR (1,2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg) e Indometacina (INDO 5 mg/kg) ou veículo (água destilada 0,1 ml/10 g); Ratos Wistar, machos (150-200 g) foram tratados com a FSM (50, 100 e 200 mg/kg), TIR (1,2 e 4 mg/kg) e INDO (5 mg/kg) ou veículo (água destilada 1 ml/100 g) 1 hora antes da injeção subcutânea (0,05 ou 0,1 ml) de carragenina a 1 % na pata traseira, direita do animal. O volume da pata foi medido antes e 1, 2, 3, 4 e 24 h após a injeção de carragenina, através de pletismógrafo (Ugo Basile, Itália). O volume do edema foi determinado em ml pela diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção da carragenina.

2.2.16 Edema de pata induzido dextrano em camundongos e ratos

Os ensaios foram realizados de acordo com estudos anteriores (CUNHA *et al.*, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2001). Camundongos Swiss, machos (25-30 g) foram tratados por via oral com a FSM (50 e 100 mg/kg), TIR (1,2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg) e Ciproheptadina (CIPRO 5 mg/kg) ou veículo (água destilada 0,1 ml/10 g); Ratos Wistar, machos (150-200 g) foram tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg), TIR (1,2 e 4 mg/kg) e CIPRO (10 mg/kg) ou veículo (água destilada 1 ml/100 g) 1 hora antes da injeção subcutânea (0,05 ou 0,1 ml) na pata traseira direita de dextrano a 1,5 %. O volume da pata foi medido antes e 1, 2, 3 e 4h após a injeção de dextrano, através de pletismógrafo (Ugo Basile, Itália). O volume do edema foi determinado em ml pela diferença entre o volume da pata nos referidos intervalos de tempo e o volume antes da injeção do dextrano.

2.2.17 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 4.0 (USA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e a comparação entre as médias foi realizada utilizando-se o teste 't' de Student pareado para comparações entre duas médias, ou análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da atividade hipoglicemiante da FSM no TOTG em ratos

A administração da FSM (50 mg/kg,v.o), 30 min após a sobrecarga de glicose reduziu a glicemia em 19 % ($151,8 \pm 9,63$ mg/dL, n=8) da mesma forma que a dose de 100 mg/kg, v.o causou uma redução de 18,5% ($152,3 \pm 10,82$ mg/dL, n=7) quando comparadas ao CH (controle hiperglicêmico) que foi de $186,9 \pm 9,53$ mg/dL, n= 7). A redução da glicemia foi significativa 90 min após o tratamento com a dose de 100 mg/kg, 17 % ($113,7 \pm 6,54$ mg/dL), quando comparada com o CH ($136,6 \pm 7,16$ mg/dL). A GLI (5 mg/kg, v.o, n=8), utilizada como padrão, reduziu a glicemia em 42 % ($95,4 \pm 2,13$), 37 % ($85,5 \pm 3,20$) e 49% ($60,6 \pm 3,96$ mg/dL) quando comparada aos controles hiperglicêmicos nos tempos 60, 90 e 120 min ($164,7 \pm 7,32$; $136,6 \pm 7,16$ e $118,6 \pm 6,89$ mg/dL), (**Tabela 6**).

3.2 Avaliação da glicemia em ratos normoglicêmicos tratados com a FSM, TIR e GLI

Visto que a FSM e GLI reduziram a glicemia (mg/dL) em ratos com sobrecarga de glicose, resolvemos avaliar o efeito das mesmas e da TIR em ratos normoglicêmicos tratados por 5 dias A administração oral da FSM (100mg/kg) durante 5 dias de tratamento reduziu em 24 % ($67,6 \pm 2,58$ mg/dL; n=14) a glicemia quando comparada com o mesmo grupo antes do tratamento ($88,8 \pm 1,43$ mg/dL, n=8). Entretanto, a Tiramina nas doses de 2 ($82,4 \pm 1,69$, n=8) e 4 mg/kg,v.o ($83,7 \pm 3,21$ mg/dL,n=7) não causou redução significativa da glicemia quando comparada com os respectivos grupos antes do tratamento ($89,3 \pm 1,43$, n=8; $90,1 \pm 2,84$, n=7). Já com a droga padrão GLI 5 mg/kg,v.o a redução foi maior, sendo em torno de 53 % ($43,6 \pm 2,46$ mg/dL, n=13) quando comparado ao mesmo grupo antes do tratamento ($93,7 \pm 2,16$; n=13),(**Figura 9**).

Tabela 6 -Teste de Tolerância a Glicose em Ratos Normoglicêmicos tratados com tratados com a Fração Solúvel em Metanol de *Cissus verticillata* (FSM) e Glibenclamida (GLI)

Grupos (mg/kg, v.o)	Tempo (min) (Média ± EPM mg/dL)				
	0	30	60	90	120
C N (08)	85,5 ± 3,84	88,5 ± 3,63	110,5 ± 5,29	99,3 ± 4,28	87,6 ± 3,86
CH (07)	87,3 ± 4,35	186,9 ± 9,53	164,7 ± 7,32	136,6 ± 7,16	118,6 ± 6,89
FSM 50 (08)	85,8 ± 5,19	151,8± 9,63 ^a	155,6 ± 5,85	131,3 ± 4,32	123,3 ± 9,22
FSM 100 (07)	77,1 ± 1,06	152,3±10,82 ^a	156,9 ± 9,50	113,7 ± 6,54 ^a	115,1 ± 7,78
GLI 5 (08)	86,6 ± 4,52	108,8 ± 5,19 ^a	95,4 ± 2,13 ^a	85,5 ± 3,20 ^a	60,6 ± 3,96 ^a

A glicemia foi avaliada antes (Tempo = 0) de ratos em jejum de 12 horas. Logo em seguida os animais foram pré-tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) por via oral e 30 minutos depois foram tratados com glicose 3g/kg,v.o e a glicemia foi medida nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após as administração da glicose. Os valores representam a Média ± EPM de 7-8 animais por grupo ^ap<0,05 em relação ao respectivo controle hiperglicêmico (CH) de cada tempo (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*.

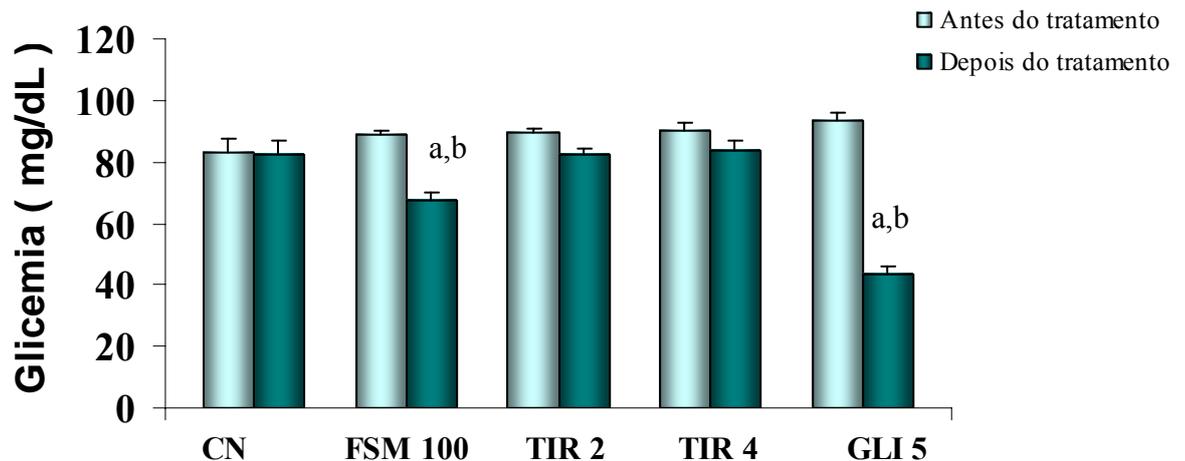


Figura 9 - Avaliação da glicemia de ratos normoglicêmicos antes e depois do tratamento por 5 dias com a Fração Solúvel em Metanol 100 mg/kg,v.o (FSM 100), tiramina 2 e 4 mg/kg.v.o (TIR 2 e 4) e Glibenclamida 5mg/kg,v.o. (GLI 5).

O grupo Controle Normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 7-14 animais por grupo. ^a $p < 0.05$ quando comparado com o CN (ANOVA and Student-Newman-Keuls as *post hoc*); ^b $p < 0.05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (teste t de Student pareado)

3.3 Avaliação de peso, mortalidade em ratos induzidos com ALX

A administração de ALX na dose de 60 mg/kg,i.v, causou uma redução significativa do peso (g) de 8 % ($159,8 \pm 5,26$ g; n=18) quando comparada com o peso 48 h após indução da hiperglicemia ($173,7 \pm 5,64$ g, n=50), sendo a mortalidade de 64 %. A dose de ALX 50 mg/kg,i.v., também causou uma redução significativa do peso, sendo em torno de 11 % ($236,8 \pm 23,67$ g; n=08;) quando comparada com o peso 48 h antes da indução da hiperglicemia ($266,3 \pm 25,59$ g; n=26), sendo a mortalidade de 67 %. Já a dose de ALX 40 mg/kg,i.v, teve uma redução de peso de 8,5% ($201,0 \pm 4,20$ g; n= 40) quando comparada com o peso 48 h antes da indução da hiperglicemia ($222,1 \pm 4,00$ g; n= 58), enquanto que a mortalidade foi somente de 31 % (**Tabela 7**). Mediante estes resultados a dose de ALX 40 mg/kg,i.v foi escolhida para o estudo.

3.4 Curva glicêmica com ALX 40 mg/kg, i.v.

A curva glicêmica foi utilizada para avaliar se os níveis de glicemia alteravam durante o período de tratamento.

A administração de ALX, na dose de 40 mg/kg,i.v após 48 h causou um aumento significativo da glicemia de 21 % ($353,5 \pm 19,81$, n=13) quando comparado com 24 h ($291,5 \pm 19,81$ mg/dL). Não houve diferença significativa entre a glicemia de 48 h ($353,5 \pm 19,81$, n=13) quando comparada com a glicemia de 5 dias ($346,9 \pm 15,98$ mg/dL), **Figura 10**.

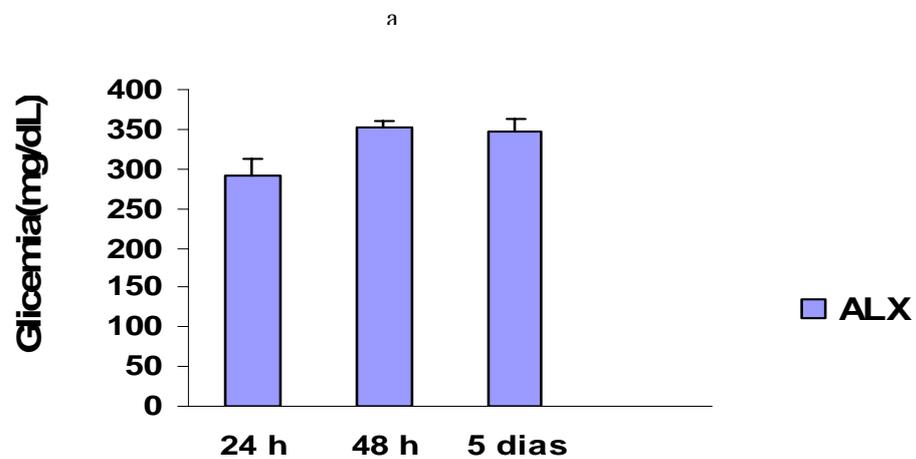


Figura 10 - Curva glicêmica com Aloxano (ALX)

Os animais foram deixados em jejum por 12 h e em seguida sob leve anestesia com éter foram injetados na veia peniana com ALX (40 mg/kg,i.v). Os valores representam Média \pm EPM da glicemia de 13 animais após 24, 48 h e 5 dias de indução do aloxano. * $p < 0,05$ quando comparado com 24 h (teste “t” pareado).

Tabela 7 - Avaliação de peso e mortalidade em ratos induzidos com aloxano (ALX)

Grupos	Dose (mg/Kg, i.v)	Pesos (g) (Média ± EPM		Peso (%)	Nº de animais		Morte (%)
		Inicial	Final		Inicial	Final	
ALX	60	173,7 ± 5,64	159,8 ± 5,26*	8,0	50	18	64
	50	266,3±25,59	236,8±23,67*	11	26	08	67
	40	222,1± 4,00	201,0 ± 4,20*	9,5	58	40	31

Os animais em jejum de 12 h foram anestesiados sob leve anestesia com éter em seguida injetados com ALX (60, 50 e 40 mg/kg,i.v) e avaliados quanto a variação de peso e mortalidade Final (5 dias) comparados com o inicial (48h após) da administração de ALX nas doses (60,50 e 40 mg/kg,i.v). Os resultados dos pesos representam a Média ± EPM de 26-58 animais por grupo. A taxa de mortalidade foi calculada tendo como base o número de animais no início e final do experimento * $p < 0,05$ quando comparado com o peso inicial (teste “t” pareado).

3.5 Avaliação da atividade hipoglicemiante no TOTG em diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR e GLI

Como a FSM causou redução da glicemia em animais normoglicêmicos após uma sobrecarga de glicose, resolvemos avaliar se este efeito também acontecia em animais diabéticos após sobrecarga de glicose.

As **Tabela 8 e 9** mostram o efeito da FSM (50 e 100 mg/kg,), GLI (5 mg/kg), FRT (100 mg/kg) e TIR (1 e 2 mg/kg) administrados por via oral em ratos diabéticos no teste de tolerância a glicose em diabéticos. Os animais controle diabético (CD) mantiveram a glicemia elevada 30 min após a sobrecarga de glicose até 120 min. Observamos que a FSM, FRT e TIR não conseguiram reverter a hiperglicemia em animais diabéticos após sobrecarga

de glicose. Da mesma forma a GLI na dose de 5 mg/kg foi ineficaz em reverter a hiperglicemia.

Tabela 8 - Teste Oral de Tolerância a Glicose em Ratos Diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol de *Cissus verticillata* (FSM) e Glibenclamida (GLI).

Grupos (mg/kg, v.o)	Tempo (min) (Média ± EPM mg/dL)				
	0	30	60	90	120
C N (08)	85,5 ± 3,84	88,5 ± 3,63	110,5 ± 5,29	99,3 ± 4,28	87,6 ± 3,86
CD (07)	403,4 ± 33,42	546,2±14,60	549,5±24,68	552,8±24,41	569,8±27,01
FSM 50 (06)	396,7 ± 40,66	516,2±73,71	572,3±74,58	584,3±73,08	567,5±27,01
FSM 100 (06)	421,2 ± 37,28	463,4±68,66	441,7±68,09	460,6±79,91	447,3±80,20
GLI 5 (06)	493,2 ± 24,85	683,5±15,54	682,5±17,88	700,3±12,33	645,8±8,31

Os valores representam a Média ± EPM de 6-8 animais por grupo. A glicemia foi avaliada antes (Tempo = 0) de ratos em jejum de 12 horas, 48 h após a administração de aloxano 40 mg/kg,i.v. Logo em seguida os animais foram pré-tratados com água destilada (CD), FSM (50 e 100 mg/kg,v.o) e GLI (5 mg/kg,v.o) e 30 minutos depois foram tratados com glicose 3 g/kg,v.o e a glicemia foi medida nos tempos 30, 60.90 e 120 minutos após as administração da glicose. O Grupo Controle Normal (CN) foi usado com animais normoglicêmicos. Não houve redução significativa da glicemia em relação ao controle (Tempo= 0 de cada grupo tratado), teste t pareado.

Tabela 9 - Teste Oral de Tolerância à Glicose em Ratos Diabéticos tratados com a Fração Rica em Tiramina de *Cissus verticillata* (FRT) e Tiramina (TIR)

Grupos (mg/kg, v.o)	Tempo (min) (Média ± EPM mg/dL)				
	0	30	60	90	120
C N (08)	85,5 ± 3,84	88,5 ± 3,63	110,5 ± 5,29	99,3 ± 4,28	87,6 ± 3,86
CD (07)	403,4 ± 33,42	546,2 ± 14,60	549,5 ± 24,68	552,8 ± 24,41	569,8 ± 27,01
FRT 100 (06)	301,3 ± 31,70	359,7 ± 2,93	356,5 ± 0,50	345,7 ± 3,53	351,0 ± 1,48
TIR 1 (07)	312,1 ± 32,17	377,1 ± 30,25	378,6 ± 21,64	391,4 ± 27,33	382,7 ± 24,40
TIR 2 (07)	340,0 ± 3 2,82	347,3 ± 21,41	361,3 ± 12,72	385,6 ± 9,86	437,7 ± 43,09

Os valores representam a Média ± EPM de 6-8 animais por grupo. A glicemia foi avaliada antes (Tempo = 0) de ratos em jejum de 12 horas, 48 h após a administração de aloxano 40 mg/kg,i.v. Logo em seguida os animais foram pré-tratados com água destilada (CD), FRT (100 mg/kg,v.o) e TIR (1 e 2 mg/kg,v.o) e 30 minutos depois foram tratados com glicose 3 g/kg,v.o e a glicemia foi medida nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após as administração da glicose.O Grupo Controle Normal (CN) foi usado com animais normoglicêmicos Não houve redução significativa da glicemia em relação ao controle (Tempo= 0 de cada grupo tratado) , teste t pareado.

3.6 Avaliação da atividade hipoglicemiante em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT e TIR e as associações (FSM +TIR e GLI +TIR)

Visto que não houve redução da glicemia em animais diabéticos com sobrecarga de glicose, avaliamos a glicemia de animais diabéticos após tratamento de 5 dias. O tratamento de ratos machos com a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o), durante 5 dias, causou reduções da glicemia de 28 (295,5 ± 26,04, n= 20) e 46 % (191,7 ± 19,71, n= 22), respectivamente em relação aos controles antes do tratamento (410,7 ± 32,29 ; 354,7 ± 21,29 mg/dL). A droga padrão GLI (5 mg/kg,v.o) causou uma redução de 45 % (210,3 ± 30,67, n=12) quando comparada ao seu controle (385,4 ± 17,63 mg/dL) semelhante a redução da glicemia com FSM 100 mg/kg,v.o. **Figura 11A).**

O tratamento de ratos machos com a FRT (100 mg/kg,v.o), durante 5 dias causou uma redução da glicemia de 64 % (158,7 ± 20,72 , n= 6) quando comparada com o controle antes do tratamento (442,3 ± 57,12 mg/dL). A TIR na menor dose 1 mg/kg,v.o causou uma redução de 41 % (219,9 ± 14,25, n=13) quando comparada com o seu respectivo controle (373,5 ± 27,15 mg/dL). As doses maiores, 2 e 4 mg/kg,v.o causaram reduções de 33 % (171,9 ± 25,33 , n=7) e 24 % (188,5 ± 18,57, n=8) quando comparadas com os seus respectivos controles (257,3 ± 21,34 e 248,0 ± 14,24 mg/dL), **(Figura 11B).**

Visto que a FSM (50 mg/kg), TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) causaram reduções significativas da glicemia de 28, 41 e 45 % **(Figuras 11A, 11B)** resolvemos avaliar se associação das mesmas levaria a uma potencialização de seus efeitos.

Quando associamos FSM 50 + TIR 1 e GLI 5 + TIR 1 a redução da glicemia foi de 36 % (238,0 ± 21,20, n= 9) e 32 % (256,1 ± 33,31, n=7) quando comparada com os seus respectivos controles (370,6 ± 46,77; 374,6 ± 20,34 mg/dL), demonstrando que não houve potencialização **(Figura 12).**

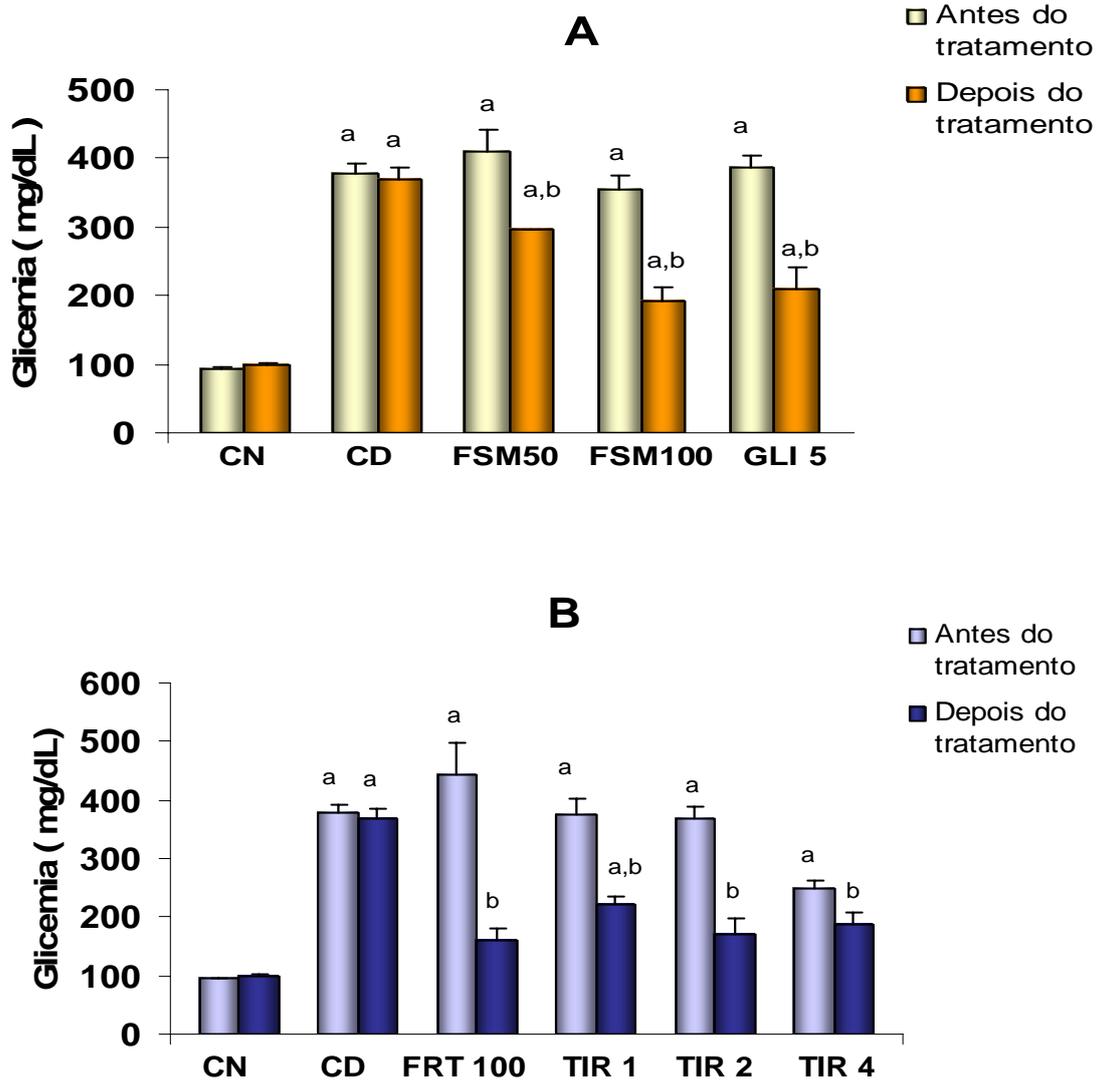


Figura 11 - Avaliação da glicemia de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI), figura 11 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 11 (B).

A glicemia foi medida no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a Fração Solúvel em Metanol (FSM 50 e 100 mg/kg) e Glibenclamida 5 mg/kg (GLI 5), figura 3 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina 100 mg/kg (FRT 100) e Tiramina 1, 2 e 4 mg/kg (TIR 1,2 e 4), via oral por 5 dias, figura 3 (B). O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-38 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado

com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

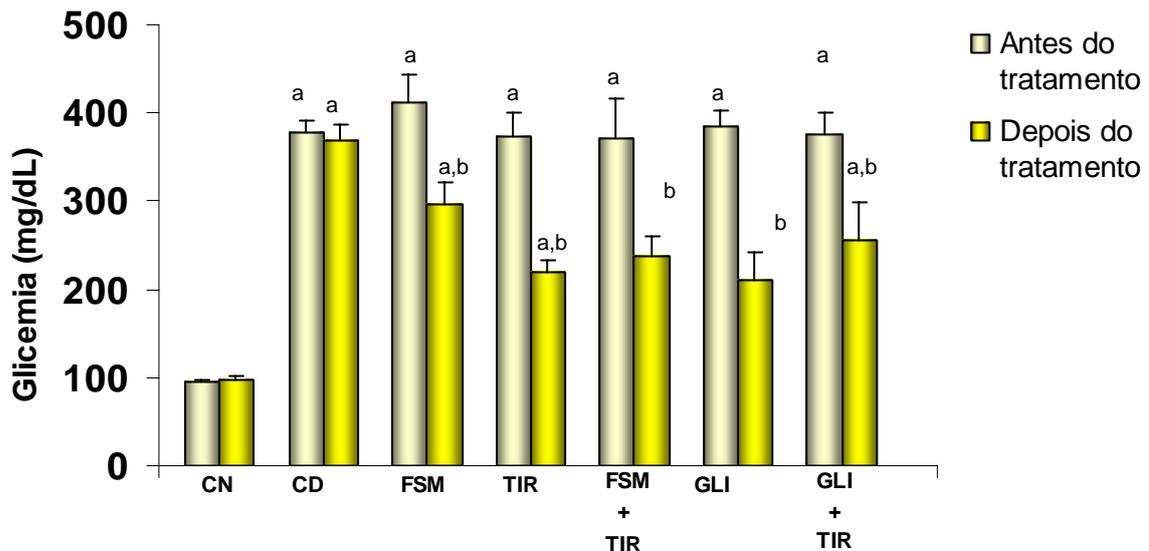


Figura 12 - Avaliação da glicemia de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM+TIR e GLI + TIR)

A glicemia foi medida no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a a FSM (50 mg/kg), TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) e as associações FSM (50mg/kg) + TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 9-38 animais por grupo. ^a p<0,05 quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.7 Avaliação do Triglicerídios e VLDL em ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR, GLI) e as associações (FSM+TIR e GLI+TIR)

Desde que sabemos que os triglicerídios, VLDL, colesterol e HDL geralmente estão alterados em diabéticos, prosseguimos com o objetivo de avaliar se o tratamento com as frações e a tiramina levaria a alterações nestes parâmetros.

As **Figura 13A e a 15A** mostram que a FSM (50 mg/kg,v.o.) reduziu os triglicerídios e VLDL em 44 % ($99,5 \pm 5,97$ e $19,9 \pm 1,19$, n= 13) quando comparada com os seus respectivos controles ($177,0 \pm 17,47$ e $35,4 \pm 3,49$ mg/dL), enquanto que a redução com FSM (100 mg/kg,v.o) foi de 54 % ($152,4 \pm 17,76$ e $14,1 \pm 0,93$, n= 29) quando comparada com os seus respectivos controles ($70,5 \pm 4,67$ e $30,5 \pm 3,55$ mg/dL). A redução dos triglicerídios e VLDL foi semelhante com a droga padrão GLI (5 mg/kg,v.o) cuja redução foi também de 54 % ($167,7 \pm 20,15$ e $15,4 \pm 1,96$, n= 16) quando comparada com os seus respectivos controles antes do tratamento ($76,9 \pm 9,78$ e $33,5 \pm 4,03$ mg/dL).

A FRT (100 mg/kg,v.o) reduziu os triglicerídios e VLDL em 66 % ($86,3 \pm 10,70$ e $17,3 \pm 2,14$, n= 6) quando comparada com o seu respectivo controle ($253,7 \pm 14,03$ e $50,9 \pm 2,79$ mg/dL). Observa-se que a TIR (1mg/kg, v.o.) causou reduções do TRI e VLDL que foram de 57 % ($98,8 \pm 8,96$ e $19,8 \pm 1,79$, n= 19) quando comparada com os seus respectivos controle ($228,8 \pm 16,78$ e $45,3 \pm 3,40$ mg/dL). Da mesma forma a TIR (2mg/kg,v.o.) causou reduções do TRI e VLDL de 57 % ($64,2 \pm 6,50$ e $12,8 \pm 1,30$, n= 10) quando comparada com os seus respectivos controles ($149,4 \pm 11,86$ e $29,9 \pm 2,38$ mg/dL), enquanto que redução menor 54 % ($73,4 \pm 15,79$, n=7) ocorreu com a TIR 4, quando comparada com o seu respectivo controle ($160,3 \pm 23,10$ mg/dL), mostrando que o aumento da dose não aumentou a redução do TRI e VLDL em relação as doses menores (**figura 13B e 15B**)

A **Figuras 14 e 16** mostram que a associação FSM+TIR causou uma redução dos triglicerídios e VLDL na ordem de 41 % ($170,8 \pm 25,33$ e $20,3 \pm 1,30$, n=9) quando comparada com os controles ($101,5 \pm 6,47$ e $34,2 \pm 5,07$ mg/dL). Estes resultados mostram que não houve potencialização dos efeitos já que TIR (1 mg/kg) sozinha causou uma redução de TRI e VLDL na ordem de 44 % ($99,5 \pm 5,97$ e $19,5 \pm 1,19$) quando comparada com os respectivos controles ($177,0 \pm 17,47$ e $35,4 \pm 3,49$ mg/dL). Já a associação GLI+TIR causou uma redução dos triglicerídios e VLDL da ordem de 49% ($134,0 \pm 24,60$ e $26,8 \pm 4,92$, n=6) quando comparada com os seus controle ($262,5 \pm 28,13$ e $52,3 \pm 5,54$ mg/dL). enquanto que

as reduções de GLI sozinha em relação ao TRI e VLDL foi de 54 % ($76,9 \pm 9,78$ e $15,4 \pm 1,93$) quando comparada com os seus respectivos controles ($167,7 \pm 20,2$ e $33,5 \pm 4,03$ mg/dL). Da mesma forma que TIR sozinha em relação ao TRI e VLDL foi de 57 % ($98,79 \pm 8,96$ e $19,77 \pm 1,79$) quando comparada com os seus controles ($228,8 \pm 16,78$ e $45,62 \pm 3,40$ mg/dL). Estes resultados mostram que a associação não aumentou o efeito da redução do TRI e VLDL.

3.8 Avaliação do colesterol e HDL em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT, TIR, GLI) e as associações (FSM+TIR e GLI+TIR)

Com relação ao colesterol total, observamos que os animais tratados com aloxano 40 mg/kg,i.v, não alteraram de modo significativo os níveis de colesterol total , nos controles diabéticos ($78,2 \pm 4,99$ e $62,5 \pm 3,53$, n=20), quando comparados com os controles normais ($64,1 \pm 5,38$; $58,7 \pm 3,93$ mg/dL, n=10) antes e após o tratamento com água destilada. Entretanto quando comparamos o controle diabético antes do tratamento ($78,2 \pm 4,99$) com o controle diabético depois do tratamento ($62,5 \pm 3,53$) observamos uma redução de 20% do colesterol.. Entretanto houve pequenas reduções, porém significativas em relação ao colesterol total com a FSM 50 e 100 mg/kg,v.o que foram de 19 % ($60,2 \pm 3,82$, n=19) e 17 % ($53,3 \pm 3,89$, n=9) quando comparadas com os seus respectivos controles ($74,4 \pm 4,61$ e $64,4 \pm 2,80$ mg/dL), enquanto que a droga padrão GLI causou uma maior redução que foi 31 % ($53,2 \pm 4,70$, n=15) quando comparada com o seu respectivo controle ($76,9 \pm 8,08$ mg/L), **Figura 17(A)**.

Na Figura 17(B) observamos que somente a FRT e TIR 2 causaram reduções do colesterol total na ordem de 25% ($56,7 \pm 4,99$, n=6) e 18% ($43,9 \pm 1,36$, n=12) quando comparados com os seus respectivos controles ($75,5 \pm 6,35$ e $53,3 \pm 2,63$ mg/dL). A associação FSM + TIR ocasionou uma redução 20 % ($49,8 \pm 4,68$, n=6) quando comparada com o seu respectivo controle ($62,4 \pm 4,23$) e semelhante a redução da FSM 50 sozinha que foi de 20 % ($60,2 \pm 3,82$ mg/dL, n=19) quando comparada com o seu controle ($74,9 \pm 4,61$ mg/dL). TIR 1 mg/kg não causou redução ($60,3 \pm 7,23$, n=14) quando comparada com o seu controle ($68,4 \pm 5,65$ mg/dL). Já a associação GLI + TIR causou uma pequena redução de 17% ($67,8 \pm 4,63$, n=18) quando comparada com o seu controle ($81,5 \pm 5,09$ mg/dL), não mantendo a redução da GLI que foi de 31% ($53,2 \pm 4,70$, n=15) quando comparada com o seu controle ($76,9 \pm 8,08$ mg/dL), **(Figura 18)**.

Quanto ao HDL observamos que não houve alteração significativa do HDL em ratos controles diabéticos ($29,5 \pm 1,55$ e $32,4 \pm 1,73$ n=10) quando comparados com os controles normais ($33,3 \pm 2,60$ e $30,7 \pm 3,44$ mg/dL, n=40), mas observamos que somente os animais diabéticos tratados com FSM 100 mg/kg,v.o aumentaram de modo significativo o HDL na ordem de 28 %($38,4 \pm 2,45$, n= 22) quando comparado com o seu controle ($29,9 \pm 3,40$ mg/dL). Já a FSM 50 e GLI 5 não tiveram efeito sobre o HDL ($34,0 \pm 1,57$, n=22 e $22,8 \pm 3,04$, n=16) quando comparados com os respectivos controles ($32,8 \pm 4,47$ e $27,6 \pm 2,02$ mg/dL) , **(Figura 19A)**. Enquanto TIR 2 mg/kg aumentou o HDL em 30 % ($33,5 \pm 1,19$, n=7) quando comparada com o seu controle($25,7 \pm 3,47$ mg/dL), FRT 100 e TIR 1 mg/kg não tiveram efeito sobre o HDL em diabéticos ($39,0 \pm 2,96$, n=6 e $38,8 \pm 1,82$, n=6) quando comparados como os respectivos controles ($45,0 \pm 3,42$ e $33,5 \pm 0,99$ mg/dL) , **(Figura 19B)**.

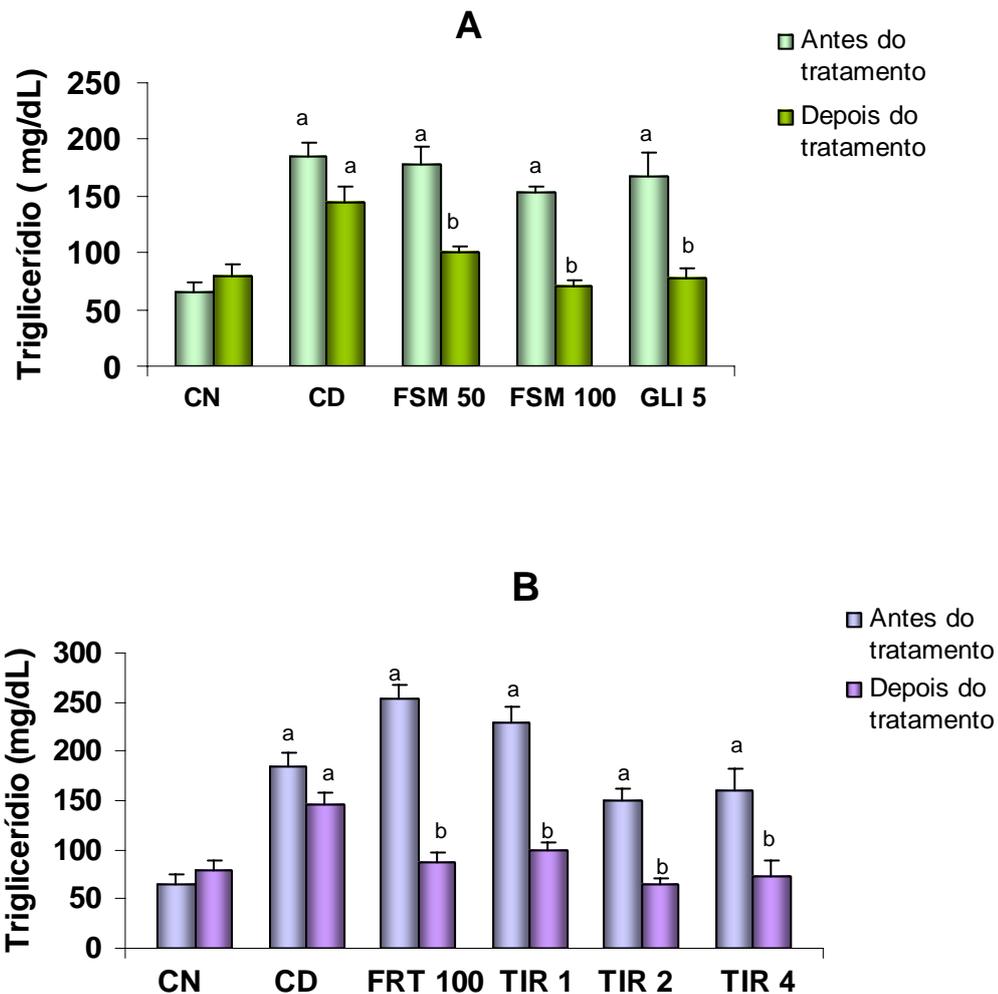


Figura 13 - Avaliação dos triglicerídios em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 13 (A) ou com a FRT e TIR, figura 13 (B)

Os triglicerídios foram medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100 mg/kg) e GLI(5 mg/kg), figura 14 (A) ou com a FRT (100 mg/kg) e TIR (1,2 e 4 mg/kg), via oral por 5 dias, figura 14(B). O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-31 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

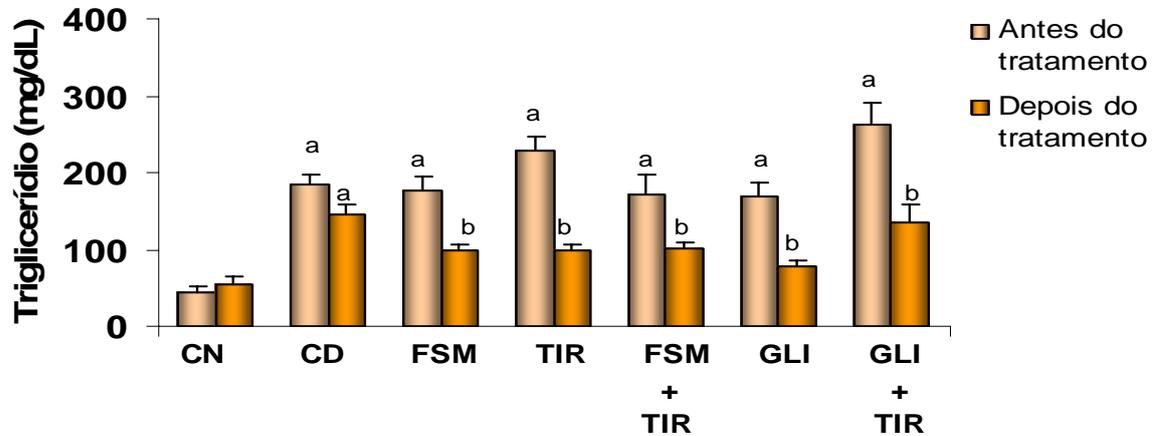


Figura 14 - Avaliação dos triglicerídios em ratos diabéticos tratados com Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR).

Os triglicerídios foram medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com FSM (50 mg/kg), TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) e as associações FSM (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-31 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

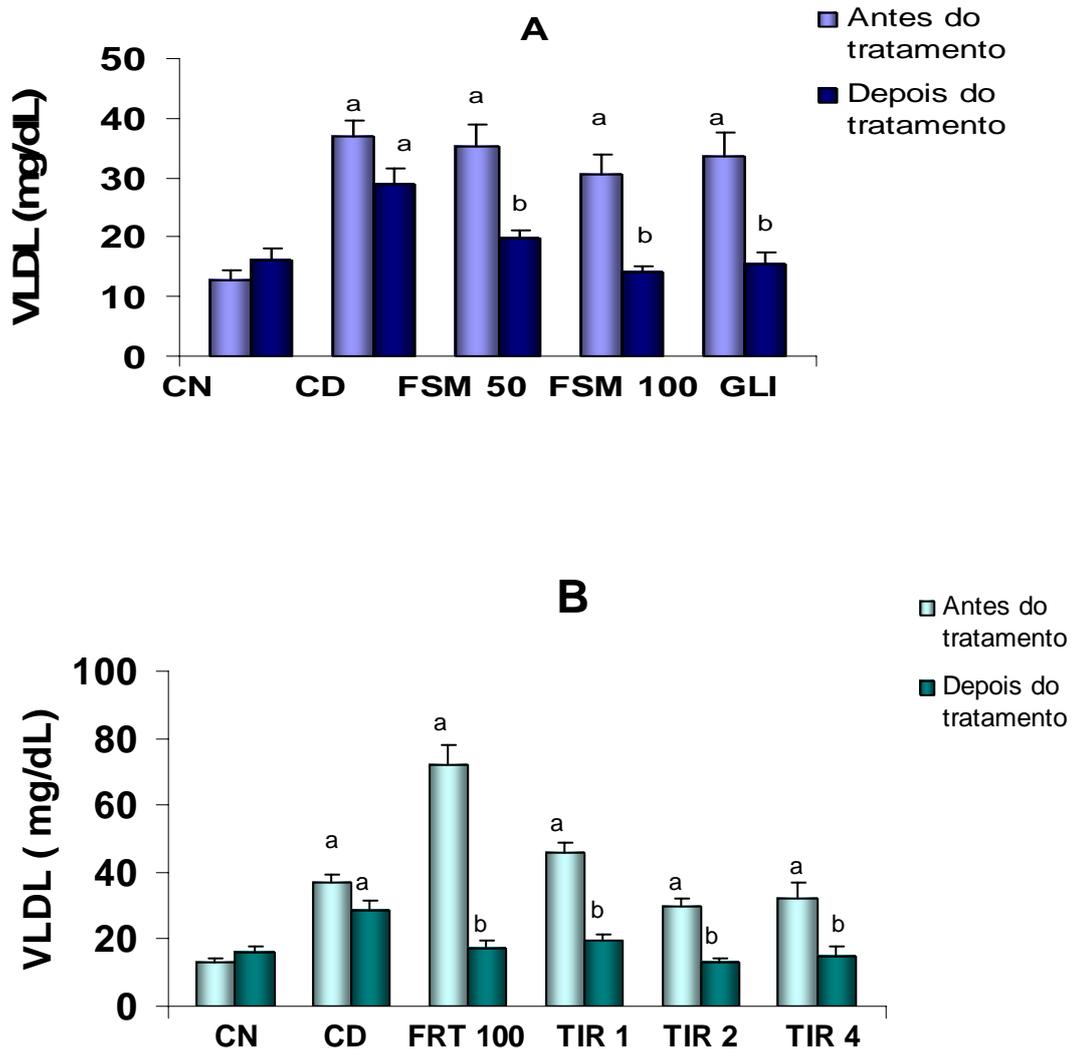


Figura 15 - Avaliação do VLDL em ratos diabéticos tratados Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 15 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 15 (B)

O VLDL foi medido no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), figura 7 (A) ou com a FRT (100 mg/kg) e TIR (1,2 e 4 mg/kg), via oral por 5 dias, figura 7 (B). O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-31 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

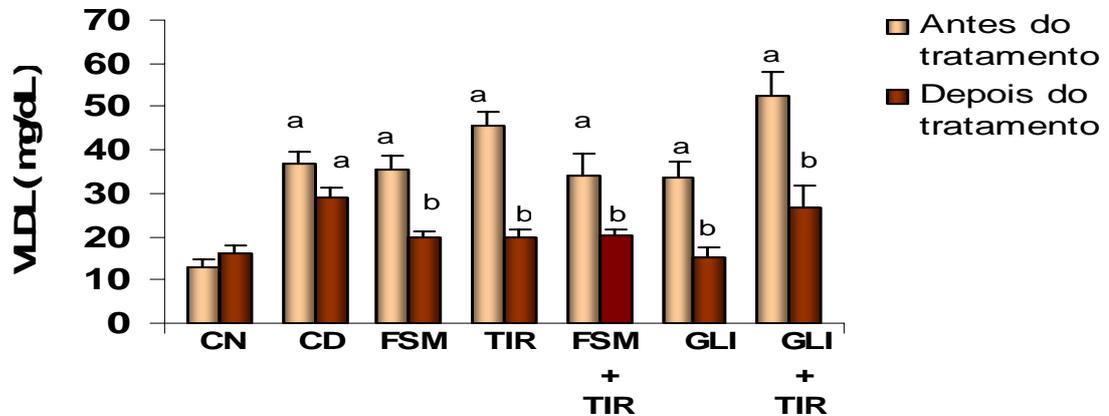


Figura 16 - Avaliação do VLDL em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI), ou com as associações FSM + TIR e GLI + TIR.

O VLDL foi medido no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 mg/kg), TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), ou com as associações FSM (50 mg/kg) + TIR (1mg/kg) e GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-31 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

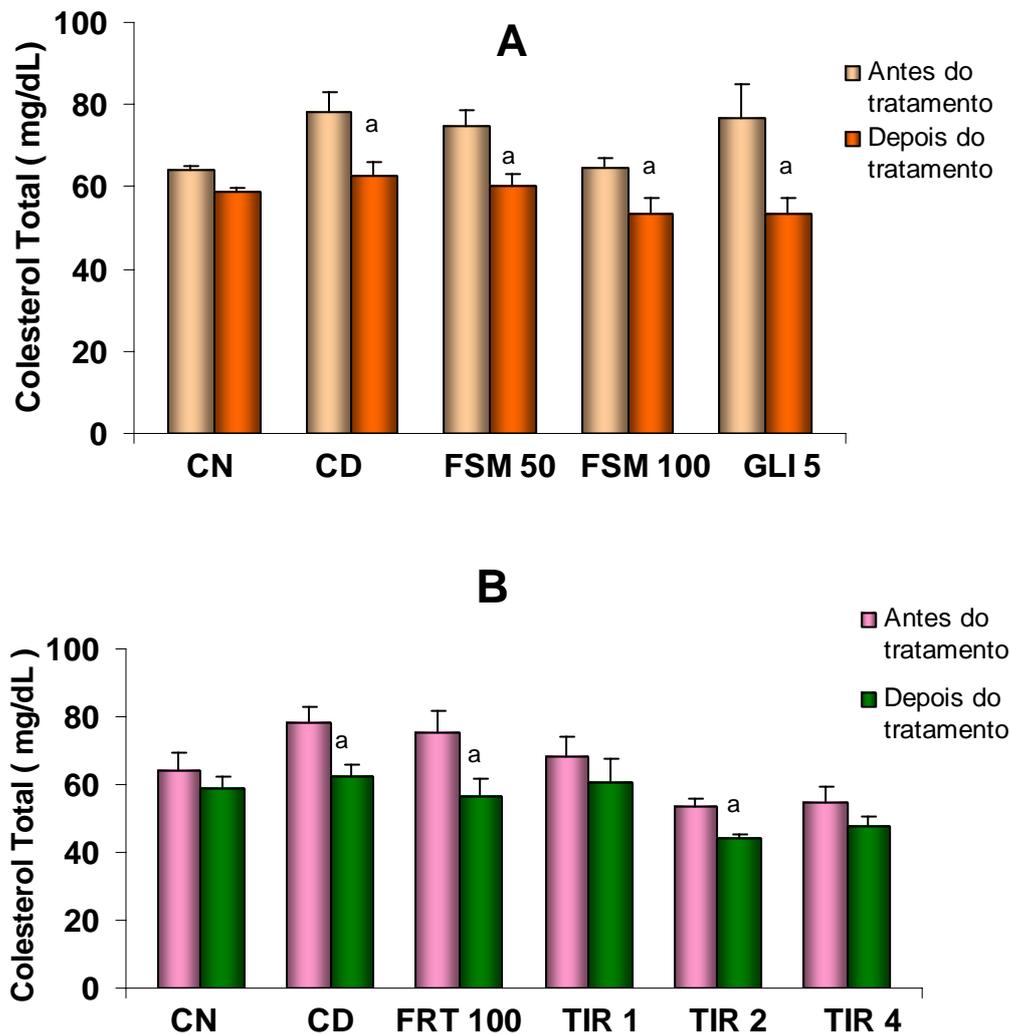


Figura 17 - Avaliação do colesterol total em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 17 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 17 (B)

O colesterol total foi medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100) e GLI (5 mg/kg), figura 9 (A) ou com a FRT (100 mg/kg) e TIR (1,2 e 4 mg/kg), via oral por 5 dias, figura 9 (B). O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-31 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

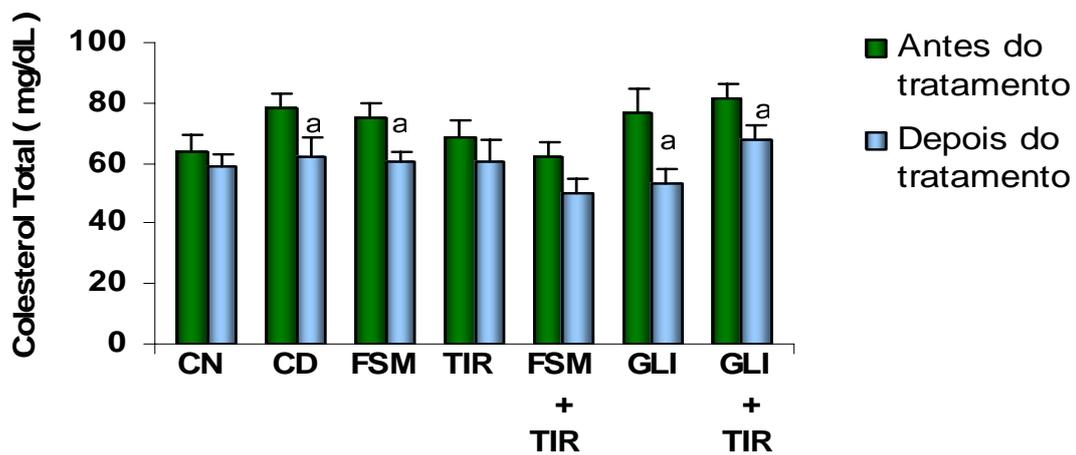


Figura 18 - Avaliação do colesterol total em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Glibenclamida (GLI), Tiramina (TIR) ou com as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)

O colesterol total foi medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 mg/kg) GLI (5 mg/kg), TIR (1 mg/kg) ou com as associações FSM (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 6-40 animais por grupo. ^ap < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

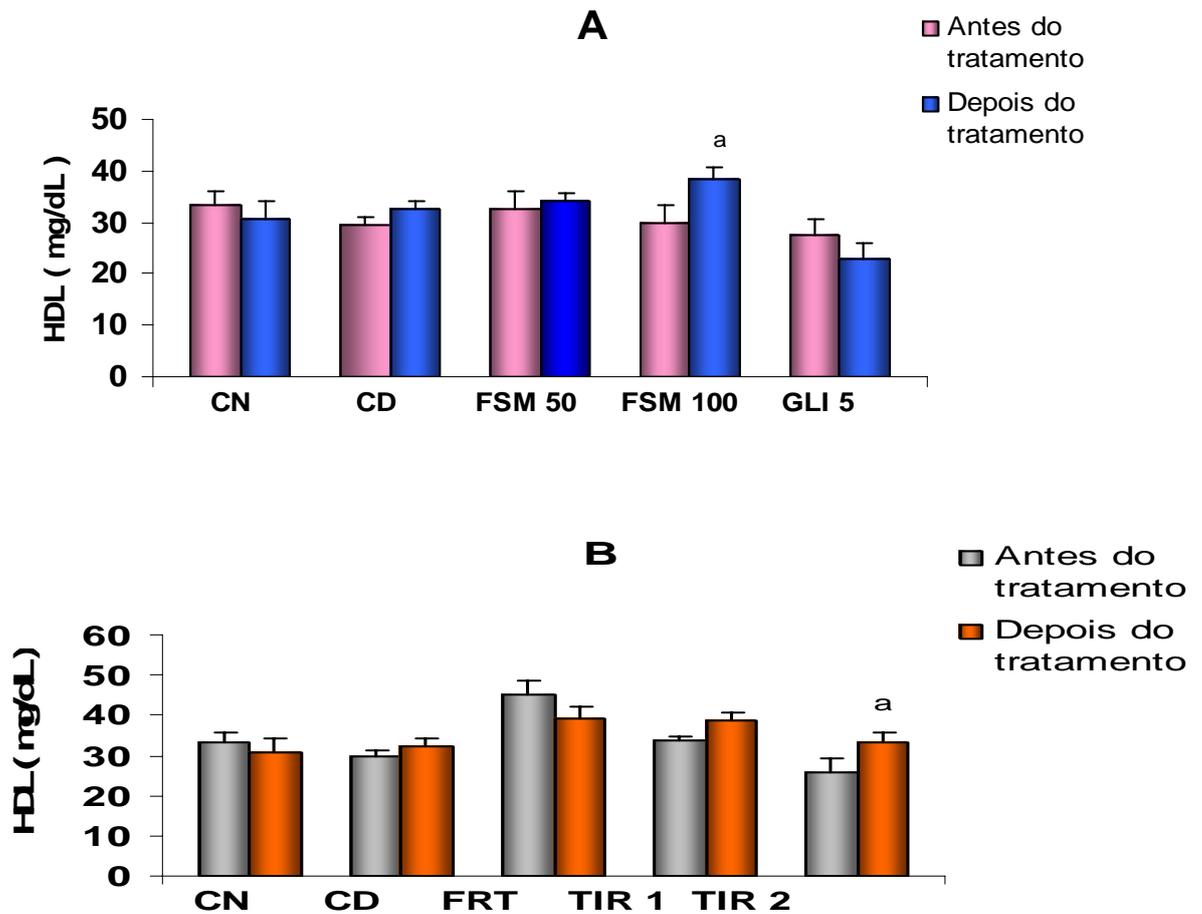


Figura 19 - Avaliação do HDL em ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI), figura 19 (A) ou com a Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR), figura 19 (B)

O HDL foi medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), figura 6(A) ou com a FRT (100 mg/kg) e TIR (1 e 2 mg/kg), via oral por 5 dias, figura 6(B). O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM de 4-40 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.9 Avaliação dos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos tratados com FSM, FRT e TIR e as associações (FSM + TIR) e (GLI + TIR)

Já que alterações nos níveis de uréia e creatinina são parâmetros para avaliação da função renal e no diabético estas alterações podem levar a complicações crônicas, resolvemos avaliar as alterações antes e após o tratamento com as frações, tiramina e glibenclamida.

O tratamento dos animais com água destilada, controles normais (CN), antes e depois do tratamento não alterou seus valores de uréia ($38,8 \pm 2,32$ e $38,0 \pm 2,26$, $n=14$) e creatinina ($0,8 \pm 0,03$ e $0,8 \pm 0,03$ mg/dL, $n=14$), entretanto nos animais controle diabético (CD) 48 h após a indução ALX 40 mg/kg.i.v, os níveis de uréia aumentaram em torno de 38 % ($53,7 \pm 4,03$, $n=15$) quando comparados com o controle normal (CN): ($38,8 \pm 2,32$, $n=14$) e estes valores permaneceram alterados 5 dias depois do tratamento em 19 % ($45,4 \pm 5,07$, $n=15$) quando comparados com o seu respectivo controle ($38,0 \pm 2,26$ mg/dL). Já os níveis de creatinina aumentaram no controle diabético (CD) em 262 % ($2,9 \pm 0,19$, $n=15$) quando comparados com o controle normal ($0,8 \pm 0,03$, $n=14$) e estes valores permaneceram alterados depois do tratamento, sendo de 200 % ($2,4 \pm 0,10$, $n=14$) quando comparados com o respectivo controle ($0,8 \pm 0,03$ mg/dL), **Tabela 10**.

Os animais tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg) apresentaram reduções de 16 % ($59,0 \pm 6,06$, $n=8$) e 25 % ($67,8 \pm 6,40$, $n=8$) quando comparados com os respectivos controles ($70,0 \pm 9,03$ e $90,8 \pm 7,18$ mg/dL) nos níveis de Uréia, e de 52 % ($1,0 \pm 0,14$, $n=8$) e 40 % ($0,9 \pm 0,13$, $n=8$) quando comparados com os respectivos controles ($2,1 \pm 0,46$ e $1,5 \pm 0,27$ mg/dL) nos níveis de creatinina. Já a FRT (100 mg/kg) reduziu em 24 % ($74,0 \pm 7,26$, $n=6$) os níveis de Uréia e em 38% ($0,8 \pm 0,11$, $n=6$) os níveis de creatinina quando comparados com os respectivos controles ($97,7 \pm 5,63$ e $1,3 \pm 0,16$ mg/dL), **Tabela 10**.

A TIR (1 mg/kg) reduziu os níveis de Uréia e Creatinina em 28 % ($33,6 \pm 5,13$, $n=10$ e $1,8 \pm 0,17$, $n=13$) quando comparados com os respectivos controles ($46,5 \pm 4,40$ e $2,5 \pm 0,21$ mg/dL). Já a TIR 2 mg/kg não reduziu os níveis de Uréia ($53,8 \pm 3,10$, $n=10$) quando comparada com o seu controle ($63,4 \pm 3,73$ mg/dL), mas somente os níveis de creatinina em 33 % ($1,2 \pm 0,15$, $n=10$) quando comparados com o respectivo controle ($1,8 \pm 0,29$ mg/dL). A droga padrão GLI (5 mg/kg) não reduziu os níveis de uréia ($60,9 \pm 3,60$, $n=10$) quando comparada como o seu controle ($67,6 \pm 6,55$ mg/dL), mas reduziu os níveis de creatinina, em 29 % ($1,0 \pm 0,07$, $n=8$) quando comparada com o seu controle ($1,4 \pm 0,15$ mg/dL). A associação FSM + TIR não alterou os níveis de uréia ($50,9 \pm 3,26$, $n=8$) quando comparada

com o seu controle ($52,0 \pm 8,00$ mg/dL), mas houve uma redução de 50 % ($0,9 \pm 0,16$, $n=8$) nos níveis de creatinina quando comparada com o controle ($1,8 \pm 0,45$). Já associação GLI + TIR não alterou os níveis de uréia ($92,1 \pm 8,83$, $n=12$) quando comparada com o seu controle ($90,5 \pm 5,88$ mg/dL), mas foi eficaz em reduzir os níveis de creatinina em 40 % ($0,90 \pm 0,04$, $n=08$) quando comparados com o seu controle ($1,5 \pm 0,20$ mg/dL), **Tabela 10**.

3.10 Avaliação dos níveis séricos de AST e ALT de ratos diabéticos tratados com FSM, FRT, TIR e GLI e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR)

Tendo em vista que as enzimas AST e ALT podem estar elevadas em diabéticos, levando a complicações crônicas, avaliamos se estas alterações estão presentes em animais induzidos com aloxano e após o tratamento com a FSM, FRT, TIR e GLI.

Na **Tabela 11** observamos que os níveis de AST (U/L) e ALT (U/L) não foram alterados em animais controle normal=CN, antes ($97,6 \pm 6,23$), nem após 5 dias de tratamento com água destilada ($87,7 \pm 6,54$, $n=10$). Da mesma forma estes níveis não estiveram alterados nos animais controle diabético (CD), injetados com aloxano 40 mg/kg,iv após 48 h = CD antes ($122,0 \pm 8,34$) e após 5 dias de tratamento= CD depois ($121,0 \pm 8,65$, $n=26$), nem em animais diabéticos tratados como a FSM (100 mg/kg), TIR (2 e 4 mg/kg), ($127,8 \pm 8,26$, $n=16$; $122,9 \pm 12,18$, $n=12$ e $115,5 \pm 11,82$, $n=07$) quando comparados com os respectivos controles antes do tratamento ($119,8 \pm 8,89$; $113,7 \pm 12,31$ e $116,4 \pm 7,76$).

Pequenas, mas significativas reduções foram observadas com a FSM (50 mg/kg) e FRT (100 mg/kg) que reduziram os níveis de AST em 18 % ($92,1 \pm 7,50$, $n=13$ e $94,4 \pm 7,31$, $n=6$) quando comparadas com os seus controles ($112,5 \pm 7,32$ e $115,0 \pm 4,70$ U/L) enquanto que os níveis de AST foram reduzidos com a TIR (1mg/kg) em 15% ($88,3 \pm 10,02$, $n=21$) quando comparados com o seu controle ($104,1 \pm 8,72$ U/L). Já a GLI (5 mg/kg) causou uma redução de 11 % ($115,0 \pm 8,34$, $n=8$) quando comparada com o seu controle ($125,3 \pm 9,25$ U/L). A associação FSM + TIR não causou alteração nos níveis de AST ($91,8 \pm 4,50$, $n=10$), quando comparada com o controle ($90,6 \pm 11,74$), entretanto a associação GLI + TIR causou uma redução de 48 % ($47,9 \pm 5,51$, $n=8$) quando comparada com o seu controle ($91,3 \pm 6,99$ U/L). **Tabela 11**.

Os níveis de ALT não ficaram alterados em animais CD antes e depois ($58,7 \pm 5,52$ e $58,7 \pm 7,25$, $n=21$) quando comparados com os animais CN antes e depois ($57,4 \pm 4,02$ e $51,3 \pm 4,95$, $n=12$). Da mesma forma o tratamento com FSM (50 e 100 mg/kg), TIR (1, 2 e 4

mg/kg) e GLI (5 mg/kg) não causaram alterações nos níveis de ALT ($55,5 \pm 5,35$; $49,4 \pm 5,75$; $38,0 \pm 2,82$; $45,3 \pm 4,41$; $39,6 \pm 7,16$; $48,4 \pm 5,96$) quando comparados com os seus controles depois do tratamento ($48,0 \pm 3,86$, n=11; $54,0 \pm 5,08$, n=13; $46,0 \pm 3,15$, n=21; $52,3 \pm 4,06$, n=12; $45,7 \pm 3,94$, n=07 e $53,7 \pm 5,52$, n=08)

Entretanto a FRT (100 mg/kg) causou uma redução de 36 % ($32,0 \pm 3,28$, n=6) quando comparada como o seu controle ($50,7 \pm 2,31$). As associações FSM + TIR e GLI + TIR causaram reduções de 20% e 22 % ($30,3 \pm 3,16$, n=10 e $29,0 \pm 0,90$, n=8) quando comparadas aos seus respectivos controles ($37,7 \pm 4,33$ e $37,3 \pm 2,07$ U/L), **Tabela 11.**

Tabela 10 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR) e (GLI + TIR) sobre os níveis séricos de uréia de creatinina, em ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	Uréia (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
CN	38,8 ± 2,32 (14)	38,0 ± 2,26	0,8 ± 0,03 (14)	0,8 ± 0,03
CD	53,7 ± 4,03 ^a (15)	45,4 ± 5,07	2,9 ± 0,19 ^a (15)	2,4 ± 0,10 ^a
FSM 50	70,0 ± 9,03 ^a (08)	59,0 ± 6,06 ^b	2,1 ± 0,46 ^a (08)	1,0 ± 0,14 ^b
FSM 100	90,8 ± 7,18 ^a (08)	67,8 ± 6,40 ^b	1,5 ± 0,27 (08)	0,9 ± 0,13 ^b
FRT 100	97,7 ± 5,63 ^a (06)	74,0 ± 7,26 ^b	1,3 ± 0,16 (06)	0,8 ± 0,11
TIR 1	46,5 ± 4,40 ^a (10)	33,6 ± 5,13 ^b	2,5 ± 0,21 ^a (13)	1,8 ± 0,17 ^b
TIR 2	63,4 ± 3,73 ^a (10)	53,8 ± 3,10 ^a	1,8 ± 0,29 ^a (10)	1,2 ± 0,15 ^b
GLI 5	67,6 ± 6,55 ^a (10)	60,9 ± 3,60 ^a	1,4 ± 0,15 (08)	1,0 ± 0,07 ^b
FSM 50+ TIR 1	52,0 ± 8,00 ^a (08)	50,9 ± 3,26 ^a	1,8 ± 0,45 (08)	0,9 ± 0,16 ^b
GLI 5 + TIR 1	90,5 ± 5,88 ^a (12)	92,1 ± 8,83 ^a	1,5 ± 0,20 (08)	0,9 ± 0,04 ^b

Os níveis de Uréia e a Creatinina foram medidas no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100 mg/kg), FRT (100 mg/kg), TIR (1 e 2 mg/kg) e as associações GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com ALX. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média ± EPM de 6-15 animais por grupo. ^a p < 0,05 quando comparado com CN (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b p < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

Tabela 11 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT) e Tiramina (TIR) e as associações (FSM + TIR e GLI + TIR) sobre os níveis séricos das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) em ratos diabéticos

Grupos/(mg/kg,v.o.)	AST (U/L)		ALT (U/L)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
CN	97,6 ± 6,23 (10)	87,7 ± 6,54	57,4 ± 4,02 (12)	51,3 ± 4,95
CD	122,0 ± 8,34 (26)	121,0 ± 8,65	58,7 ± 5,52(21)	58,7 ± 7,25
FSM 50	112,5 ± 7,32(13)	92,1 ± 7,50 ^b	48,0 ± 3,86 (11)	55,5 ± 5,35
FSM 100	127,8 ± 8,26 (16)	119,8± 8,89	54,0 ± 5,08 (13)	49,4 ± 5,75
FRT 100	115,0 ± 4,70 (06)	94,4 ± 7,31 ^b	50,7 ± 2,31 (06)	32,0 ± 3,28 ^b
TIR 1	104,1 ± 8,72 (21)	88,3± 10,02 ^b	46,0 ± 3,15 (21)	38,0 ± 2,82
TIR 2	122,9 ± 12,18 (12)	113,7 ± 12,31	52,3 ± 4,06 (12)	45,3 ± 4,41
TIR 4	115,5 ± 11,82 (07)	116,4 ± 7,76	45,7 ± 3,94 (07)	39,6 ± 7,16
GLI 5	125,3 ± 9,25 (08)	111,8 ± 6,91 ^b	53,7 ± 5,52 (08)	48,4 ± 5,96
FSM 50 + TIR 1	91,8 ± 4,50 (10)	90,6 ± 11,74	37,7 ± 4,33 (10)	30,3 ± 3,16 ^b
GLI 5 + TIR 1	91,3 ± 6,99 (08)	47,5 ± 4,60 ^{a,b}	37,3 ± 2,07 (08)	29,0 ± 0,90 ^b

Os níveis séricos de AST e ALT foram medidas no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a FSM (50 e 100 mg/kg) FRT (100 mg/kg) ,TIR (1, 2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg) e as associações FSM (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com ALX. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média ± EPM do número de animais entre parênteses. ^a p<0,05 quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.11 Avaliação da atividade antioxidante da FSM, FRT, TIR e GLI em ratos diabéticos

Visto que não houve alterações significativas nas enzimas hepáticas no soro de animais tratados com aloxano, resolvemos avaliar a hepatotoxicidade induzida pelo mesmo. Desse modo o efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre a hepatotoxicidade induzida pelo ALX foi investigado através da peroxidação lipídica, de sistemas antioxidantes enzimático (catalase) e não enzimático (glutathiona reduzida), além de dosagem de nitritos.

3.11.1 Determinação do efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre a peroxidação lipídica

Nas **Figuras 20 e 21** pode ser observado o efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre a formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico - TBARS, parâmetro empregado para mensurar a peroxidação lipídica hepática induzida por aloxano. Os resultados mostram que a dose de ALX 40 mg/kg,i.v não alterou a concentração do TBARS em ratos controle diabético (CD) ($0,6 \pm 0,07$, n=6); ($0,6 \pm 0,05$, n=11) quando comparados com os ratos controle normal (CN) ($0,6 \pm 0,08$, n=6); ($0,6 \pm 0,07$, n=9) , tratados somente com água destilada. Da mesma forma os animais diabéticos tratados com FSM (50 e 100 mg/kg), FRT (100 mg/kg), TIR (1 e 2 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), via oral por 5 dias não alteraram de modo significativo o nível de TBARS ($0,5 \pm 0,04$, n=7); ($0,6 \pm 0,10$, n=6); ($0,5 \pm 0,04$, n=6); ($0,82 \pm 0,03$, n=6); ($0,6 \pm 0,09$, n=6); ($0,7 \pm 0,08$, n=6))

3.11.2 Determinação do efeito FSM, FRT, TIR e GLI sobre o nível de glutathiona reduzida

A **Figura 22** mostra o efeito da FSM sobre a mudança na concentração de glutathiona reduzida induzida pelo ALX no fígado de ratos. O nível de glutathiona (GSH, $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido) hepática decresceu de $528,9 \pm 64,3$ no grupo controle normal (CN), tratados somente com água destilada, para $111,2 \pm 17,1$ no grupo controle diabético (CD), tratados com água e ALX. O tratamento dos animais diabéticos durante 5 dias com FSM (50 e 100 mg/kg,v.o.) aumentou significativamente o nível de glutathiona hepática em ($584,8 \pm 83,03$ e $350,6 \pm 57,58$, respectivamente).

Na **Figura 23** observamos que nível de glutathiona (GSH, $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido) hepática decresceu de $122,0 \pm 24,56$ no grupo CN, tratados somente com água destilada, para $17,1 \pm$

2,82, no grupo CD, tratados com água e ALX. O tratamento dos animais diabéticos com FRT (100 mg/kg,v.o.), via oral por 5 dias aumentou significativamente o nível de glutathione hepática em ($77,1 \pm 10,65$). Já a TIR (1 e 2 mg/kg, v.o.) e GLI (5 mg/kg,v.o) além de aumentarem o nível de glutathione, foi praticamente restabelecida a normalidade ($121,9 \pm 23,87$; $112,3 \pm 15,30$ e $92,1 \pm 6,23$).

3.11.3 Determinação do efeito FSM, FRT, TIR e GLI sobre a atividade da catalase

A **Figura 24** mostra que a atividade da catalase (mmol/min/mg proteína) no fígado de animais do grupo controle normal = CN ($132,5 \pm 19,21$, n=6) foi significativamente aumentada quando comparada ao grupo controle diabético= CD ($294,5 \pm 45,21$, n=5). Entretanto o tratamento dos animais com a FSM por 5 dias inibiu de modo significativo a atividade da catalase. Na menor dose a FSM (50 mg/kg,v.o.) reduziu significativamente a atividade da catalase ($178,2 \pm 24,71$, n=7), correspondendo a uma inibição de 45 %. Já a maior dose (100mg/kg,v.o.) causou uma redução de apenas 31 % ($193,9 \pm 25,39$, n=5), sugerindo que a atividade da catalase já atingiu seu valor máximo de inibição com a dose de 50 mg/kg, pois o aumento da dose não levou a um aumento na inibição.

A **Figura 25** mostra que a atividade da catalase aumentou de $124,6 \pm 15,07$, n=8, no grupo controle normal =CN para $291,8 \pm 38,55$, n=10 no grupo controle diabético= CD. Entretanto quando os animais foram tratados com a TIR (1 e 2 mg/kg,v.o.) aconteceram reduções de 66 ($97,9 \pm 12,45$, n=8) e 72 % ($82,1 \pm 8,77$, n=7) na atividade da catalase, enquanto que a FRT (100 mg/kg,v.o.) não teve efeito significativo. Já a GLI (5 mg/kg,v.o) causou uma redução de 41 % ($171,4 \pm 27,05$, n=10), que foi significativa e próxima dos valores da catalase nos animais CN ($124,6 \pm 15,07$).

3.11.4 Determinação do efeito da FSM, FRT, TIR e GLI sobre os níveis de nitrito/nitrato

A **Figura 26** mostra que houve aumento significativo dos nitritos (μM) nos animais diabéticos passando de $1,6 \pm 0,34$, n=6 para $14,7 \pm 2,06$, n=6. Já a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o) causou uma redução nos níveis de nitrito/ nitrato de 65 ($5,13 \pm 1,51$, n=6) e 68 % ($4,69 \pm 1,18$, n=5). As reduções foram maiores quando os animais foram tratados com a TIR (1 e 2 mg/kg,v.o.) ,sendo de 79 ($3,02 \pm 1,46$, n=4) e 82 % ($3,24 \pm 1,14$, n=6). Da mesma

forma, a GLI (5 mg/kg,v.o.) causou uma redução significativa de 78 % ($3,20 \pm 1,81$, n=5) e semelhante a redução com TIR 1 mg/kg,v.o. Já a FRT (100 mg/kg,v.o.) não apresentou efeito significativo, **Figura 27**.

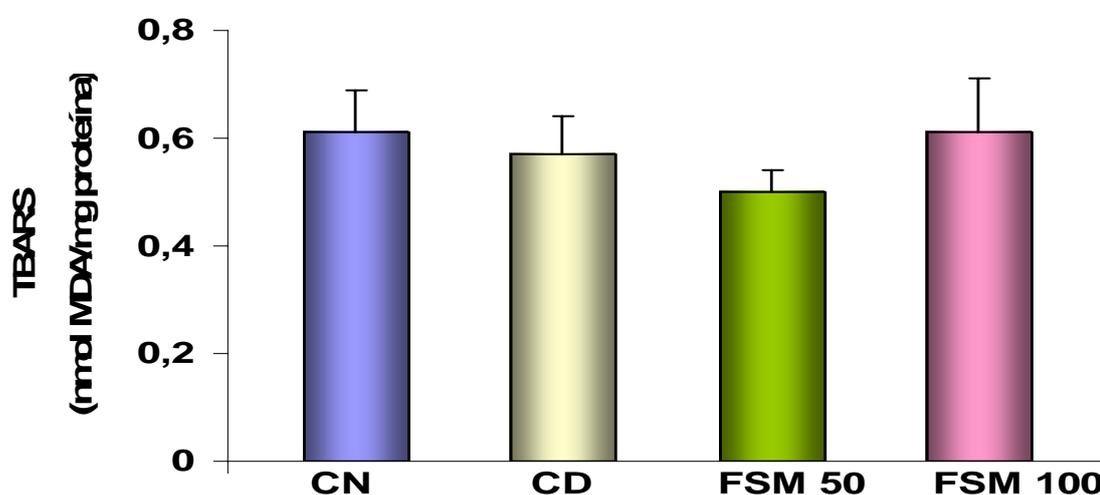


Figura 20 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico-TBARS em fígado de ratos diabéticos

Os animais foram injetados com ALX (40 mg/kg,i.v.) e 48 horas depois foram tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o.) e água destilada (CD= controle diabético) por 5 dias. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água destilada. O nível de TBARS, expresso pela concentração de malonildialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica foi determinado 5 dias após a injeção de ALX. Os valores representam a média \pm EPM de 6-7 animais por grupo. Os valores não foram estatisticamente significativos.

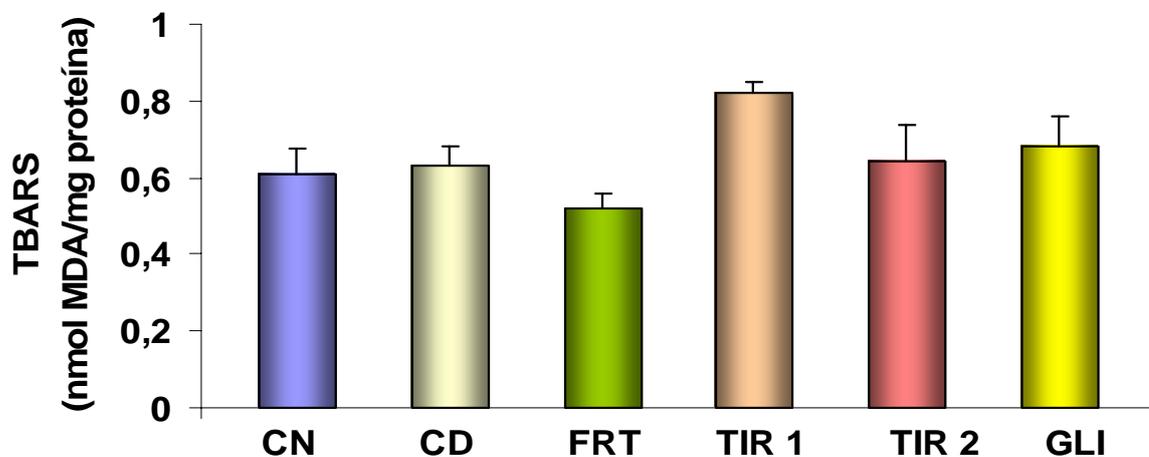


Figura 21 - Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a peroxidação lipídica, determinada pelos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico-TBARS em fígado de ratos diabéticos

Os animais foram injetados com ALX (40 mg/kg,i.v.) e 48 horas depois foram tratados por via oral com a FRT (100 mg/kg), TIR (1 e 2 mg/kg) e GLI (5 mg/kg,.) e água destilada (CD= controle diabético) por 5 dias. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água destilada. O nível de TBARS, expresso pela concentração de malonildialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica foi determinado 5 dias após a injeção de ALX. Os valores representam a média \pm EPM de 6-7 animais por grupo. Os valores não foram estatisticamente significativos.

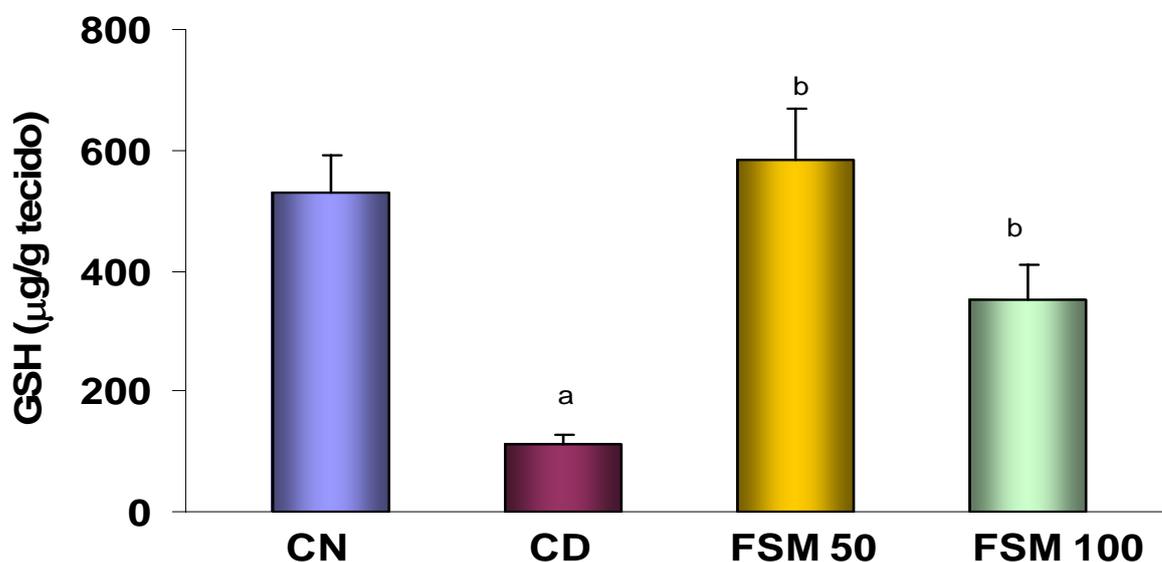


Figura 22 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a redução no nível de glutathiona reduzida (GSH) em fígado de ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o.) foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). O nível de GSH foi determinado no 5º (quinto) dia de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

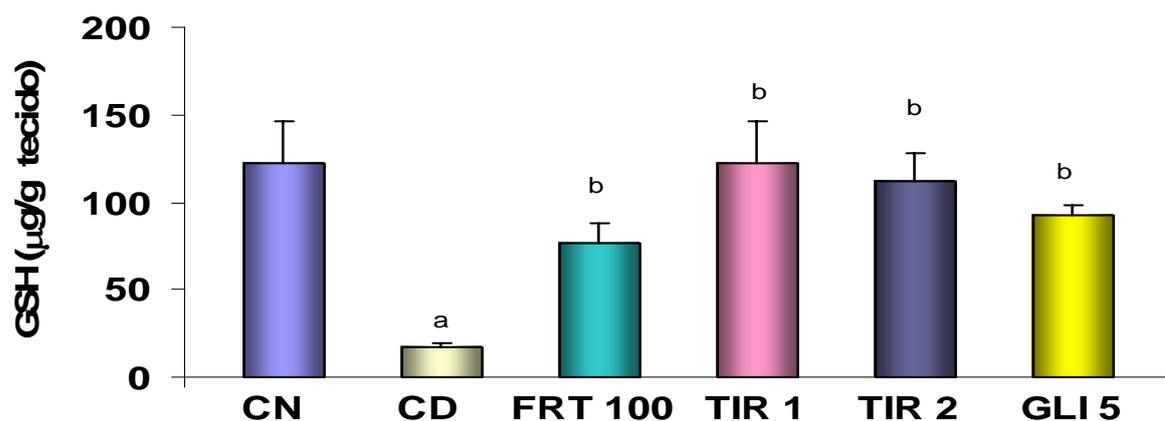


Figura 23 - Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a redução no nível de glutathiona reduzida (GSH) em fígado ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FRT (100 mg/kg.), TIR (1 e 2 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), por via oral foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). O nível de GSH foi determinado no 5º (quinto) dia de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

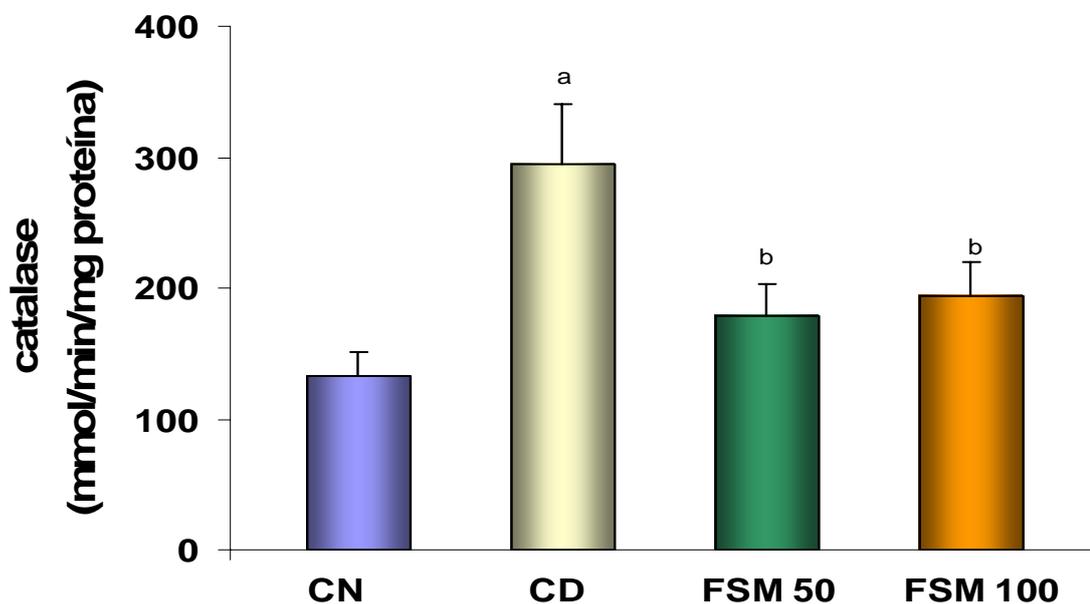


Figura 24 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o.) foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). A atividade da catalase foi determinada após 5 dias de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 5-7 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

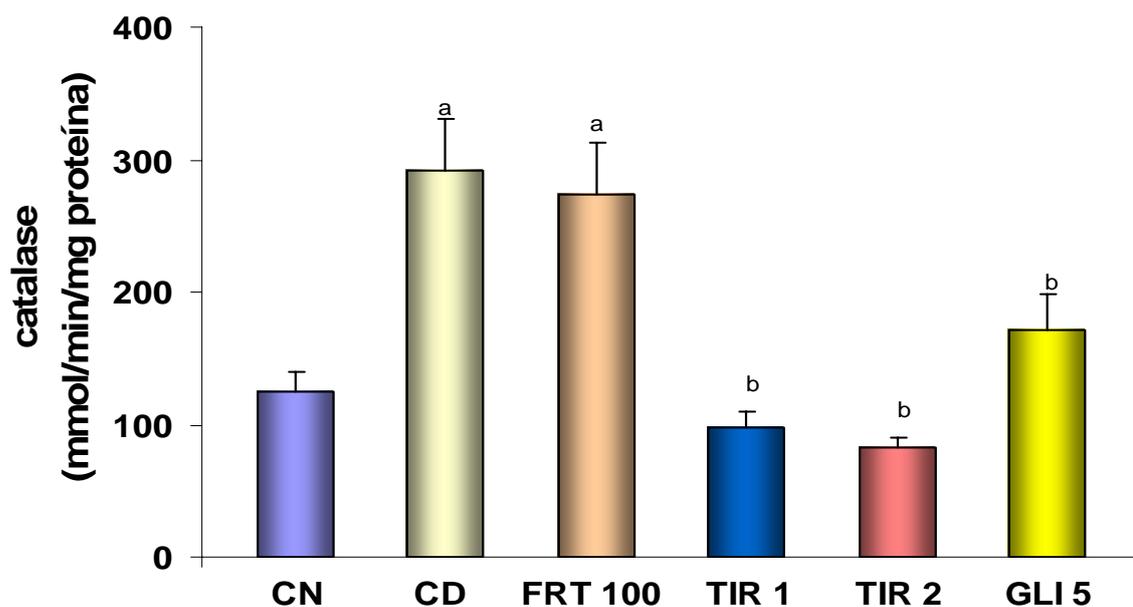


Figura 25 - Efeito da Fração Rica em Tiramnia (FRT), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a atividade da catalase em fígado de ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FRT (100 mg/kg), TIR (1 e 2 mg/kg,) e GLI (5 mg/kg), por via oral foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). A atividade da catalase foi determinada após 5 dias de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 5-10 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

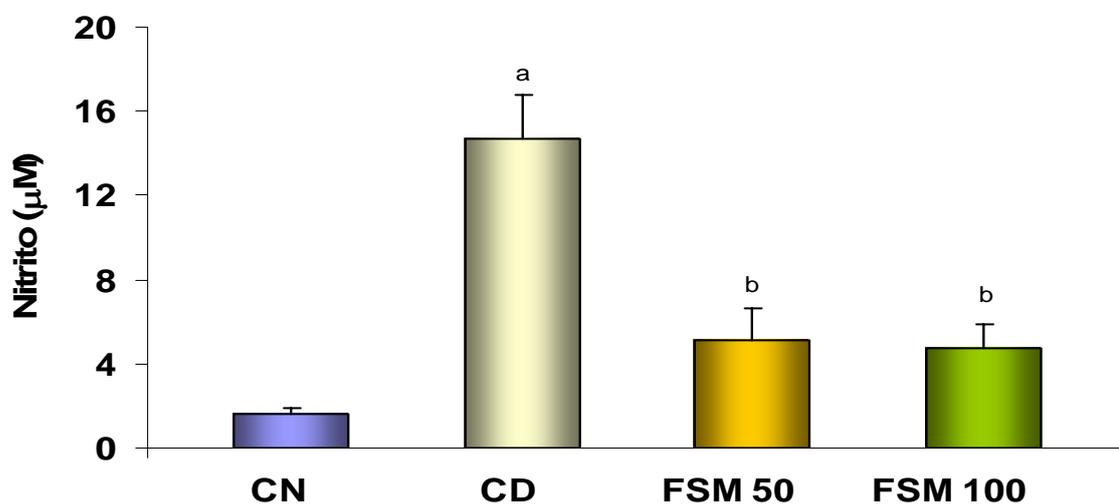


Figura 26 - Efeito da Fração Solúvel em Metanol (FSM) sobre a redução no nível de nitritos em fígado de ratos diabéticos.

O tratamento dos animais com a FSM (50 e 100 mg/kg,v.o.) foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). O nível de nitrito foi determinado no 5º (quinto) dia de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. ^ap< 0,05 em relação ao grupo CN; ^bp< 0,05 em relação ao grupo CD.

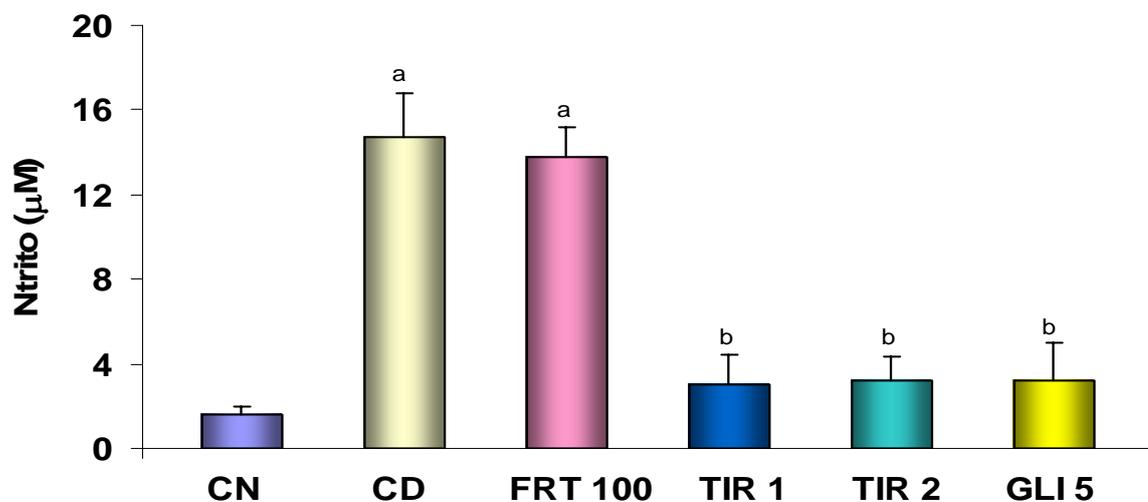


Figura 27 - Efeito da Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) sobre a redução no nível de nitrito em fígado de ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FRT (100 mg/kg), TIR (1 e 2 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), por via oral foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). O nível de nitrito foi determinado no 5º (quinto) dia de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 6 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

3.12 Dosagem de Hemoglobina glicada em ratos não diabéticos tratados com a FSM, TIR e QCT).

Na **Tabela 12**, os resultados mostram uma redução significativa da Hemoglobina Glicada (HbA1c) com a FSM e TIR (50 µg/ml), sendo de 36,5 % ($5,55 \pm 1,00$) e 40,4 ($5,21 \pm 0,89$) quando comparadas com os respectivos controles ($8,74 \pm 0,50$), enquanto que a redução com a quercetina (substância padrão utilizada) foi bem maior e de 51,3 % ($4,25 \pm 0,28$). Estes resultados apontam para a atividade antioxidante da FSM e TIR, no sangue de animais normais, mas com excesso de glicose.

3.13 Avaliação Histopatológica em pâncreas de ratos diabéticos tratados com a FSM, TIR e GLI

Nas **Figura 28 e 29** o pâncreas de rato controle diabético=CD, tratado com ALX, apresenta células necróticas vacuolizadas e com núcleo picnótico das ilhotas de Langerans, por outro lado nenhuma alteração foi observada no grupo controle normal = CN não tratado com ALX, apenas com água destilada. Já no pâncreas de ratos tratados com FSM (100 mg/kg,v.o), GLI (5 mg/kg,v.o.) e TIR (1 mg/kg,v.o.) observamos regeneração das ilhotas de Langerans, diminuindo a lesão causada pelo ALX 40 mg/kg,i.v.

Na **Figura 30** observamos uma redução de 50 % ($0,009 \pm 0,0016$, n=8) no número de ilhotas/área no pâncreas de ratos diabéticos= CD quando comparados com o controle normal=CN, tratados apenas com água destilada ($0,018 \pm 0,0028$, n=6), mostrando a toxicidade do aloxano nas ilhotas do pâncreas. Observamos também que a FSM (100 mg/kg,v.o) aumentou o número de ilhotas/área em 89 % ($0,017 \pm 0,0026$) quando comparada com o controle diabético=CD ($0,009 \pm 0,0016$), se aproximando do número de ilhotas/área do controle normal= CN ($0,018 \pm 0,0028$). Da mesma forma a droga hipoglicemiante padrão GLI (5 mg/kg,v.o.) causou um aumento de 67 % ($0,015 \pm 0,0031$, n=7) no número de ilhotas/área quando comparada com o CD ($0,009 \pm 0,0016$, n=8).

3.14 Determinação do conteúdo de Glicogênio hepático em ratos diabéticos tratados com a FSM

A **figura 31** mostra que não houve alteração significativa na dosagem de glicogênio 2 ou 24 h após a adição da enzima amilglicosidase nos animais CN, ou seja controle normal tratados apenas com água. No grupo CD, ou seja controle diabético induzido com aloxano e após 48 h tratados somente com água por 10 dias, as reduções foram significativas e semelhantes no conteúdo de glicogênio hepático dosado 2 h ($18,1 \pm 3,22$) e 24 h ($18,4 \pm 3,87$ mg/dL) após a adição da enzima, sendo de 61 %, respectivamente quando comparadas ao grupo CN 2 h ($46,3 \pm 1,31$) e 24 h ($47,0 \pm 1,71$ mg/dL). Já FSM (100 mg/kg,v.o.), aumentou em 2,4 vezes o conteúdo de glicogênio 2 h ($42,5 \pm 1,96$), havendo um decréscimo deste aumento após 24 h ($30,3 \pm 2,30$), sendo de 1,6 vezes.

Tabela 12 – Glicação in vitro da hemoglobina (4g/dL) de ratos não diabéticos, na presença de D-glicose 50 mM e a Fração Solúvel em Metanol (FSM), comparada com a Tiramina (TIR) e quercetina (QCT)

Amostra	% HBA1c	% Inibição
Controle	$8,74 \pm 0,50$ (05)	-
FSM	$5,55 \pm 1,00$ (04) ^a	36,5
TIR	$5,21 \pm 0,89$ (05) ^a	40,4
QCT	$4,25 \pm 0,28$ (04) ^a	51,3

O sangue dos ratos Wistar em jejum de 12 horas foi colhido da aorta abdominal e preparado um pool de hemáceas de 8 ratos (3 ml do sangue de cada um). Depois de obter uma solução contendo hemoglobina, amostras desta foram incubadas e as análises foram feitas em duplicatas. Os tubos controle contêm somente tampão, Hb (4 g/dL) e D-glicose 50 mM. As incubações de FSM, TIR e QCT foram realizadas na concentração de 50 µg/ml. Os valores representam a Média \pm EPM do número de tubos entre parênteses. ^ap < 0,05 em relação ao grupo controle (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*).

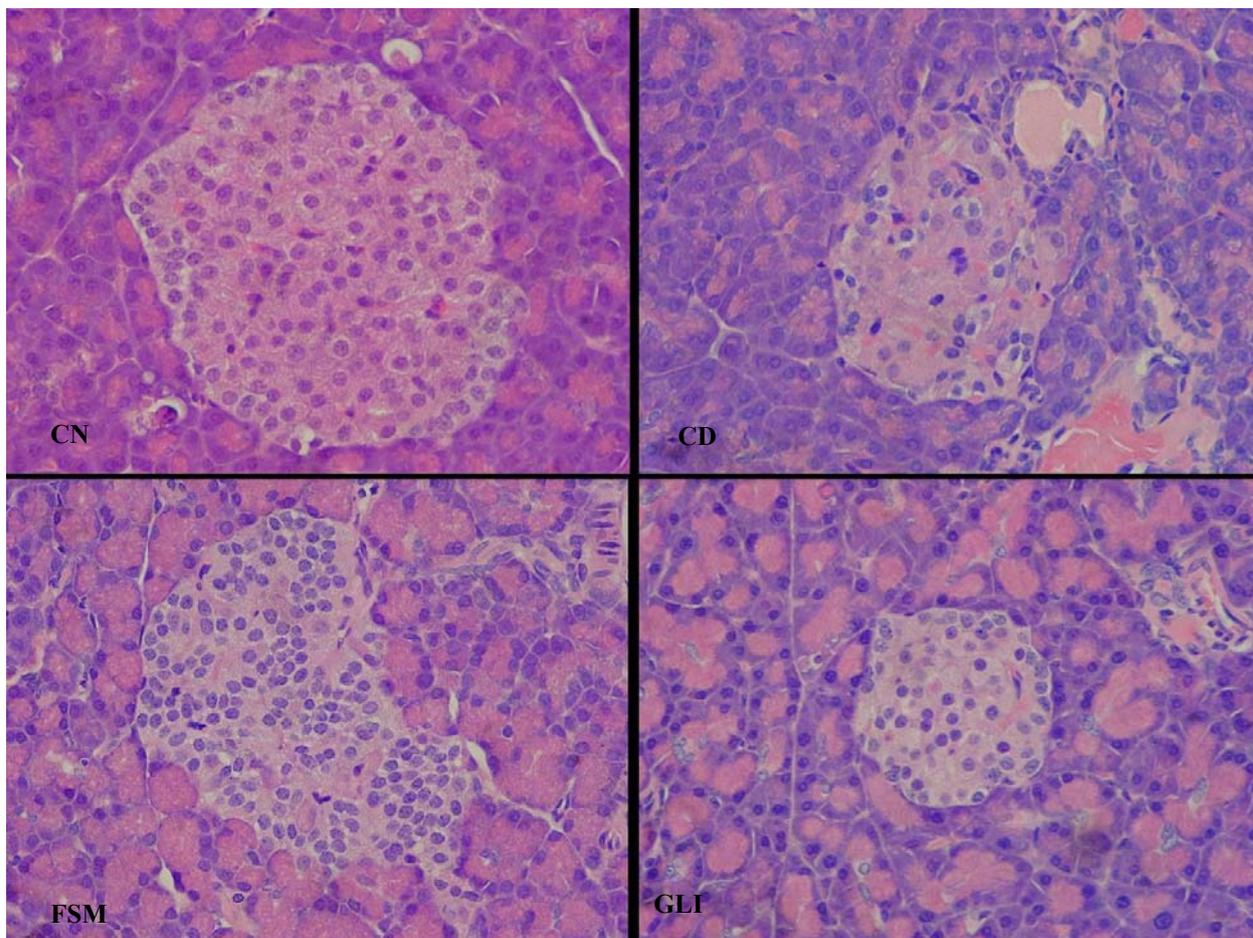


Figura 28 - Micrografia ilustrando os efeitos da Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI) em pâncreas de ratos diabéticos

Nota: **CN** – Controle Normal: ratos tratados apenas com água destilada observa-se aparência normal do pâncreas; **CD** – Controle Diabético: ratos diabéticos induzidos com ALX, presença de células necróticas vacuolizadas e com núcleo picnótico das ilhotas de Langerans. **FSM** – Pâncreas de ratos diabéticos induzidos com ALX e tratados com a FSM., diminuição da lesão das ilhotas; **GLI** - Pâncreas de ratos diabéticos induzidos com aloxano e tratados GLI, diminuição do tamanho das ilhotas de Langerans sem alteração histológica das mesmas (aumento 40x).

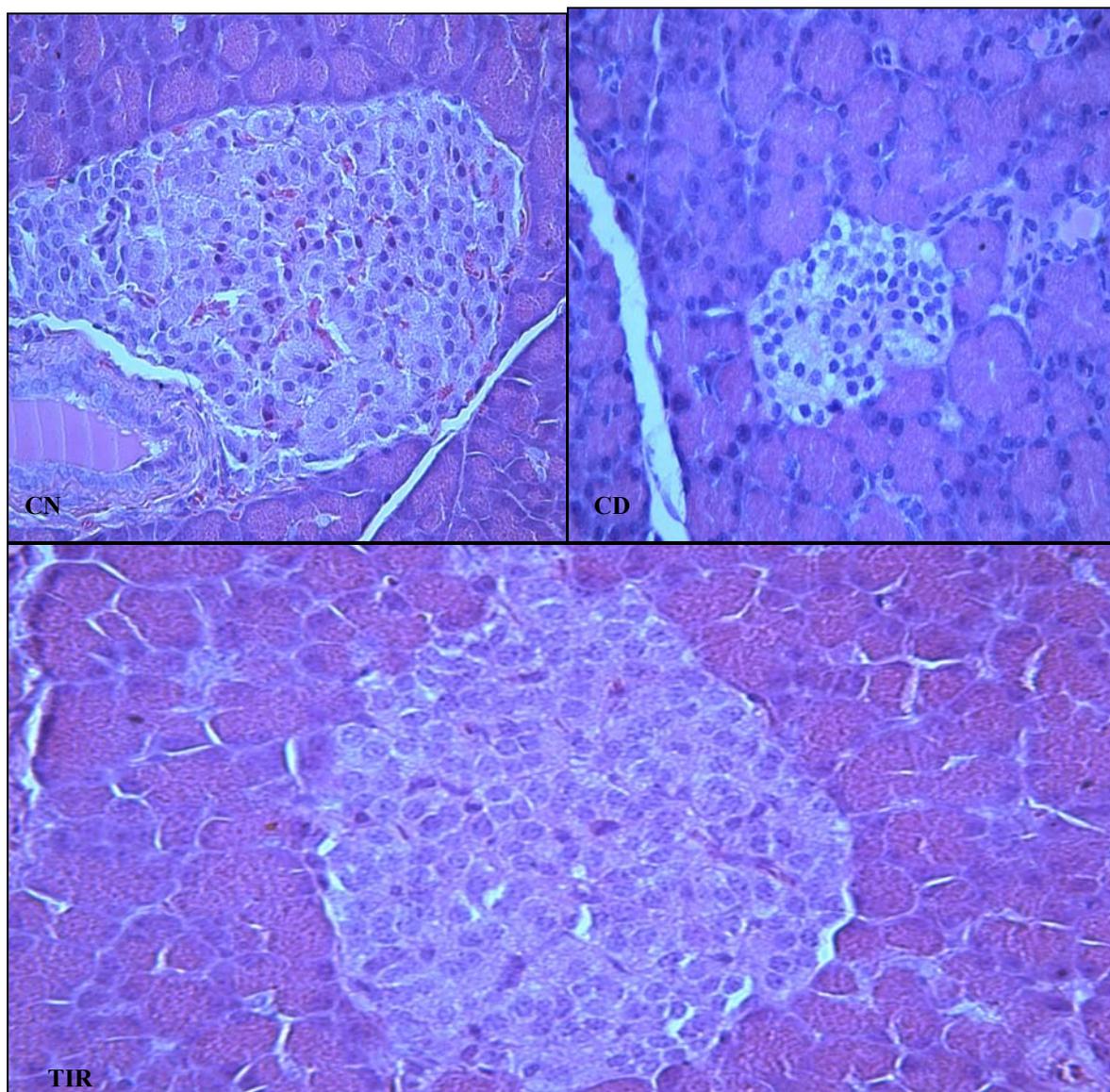


Figura 29 - Micrografia ilustrando os efeitos da Tiramina (TIR) em pâncreas de ratos diabéticos.

Nota: **CN** – Controle Normal: ratos tratados apenas com água destilada observa-se aparência normal do pâncreas; **CD** – Controle Diabético: ratos diabéticos induzidos com ALX, presença de células necróticas vacuolizadas e com núcleo picnótico das ilhotas de Langerans. **TIR** – Pâncreas de ratos diabéticos induzidos com ALX e tratados com a TIR apresentando diminuição da lesão das ilhotas (aumento 40x).

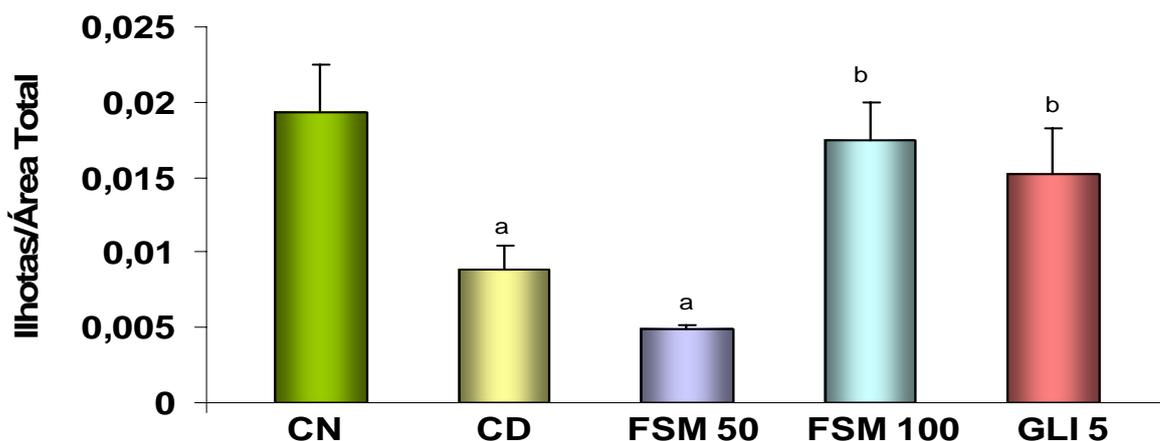


Figura 30 - Contagem de Ilhotas em pâncreas de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), e GLI (5 mg/kg)

Os animais foram tratados por 5 dias com FSM (50 e 100 mg/kg), e GLI (5 mg/kg), por via oral e no 5º dia de tratamento o pâncreas foi retirado e corado com hematoxilina-eosina e o número de ilhotas foi contado com o auxílio de microscópio ótico. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX (40 mg/kg,i.v.) e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 6-8 animais por grupo. ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo CN; ^b $p < 0,05$ em relação ao grupo CD.

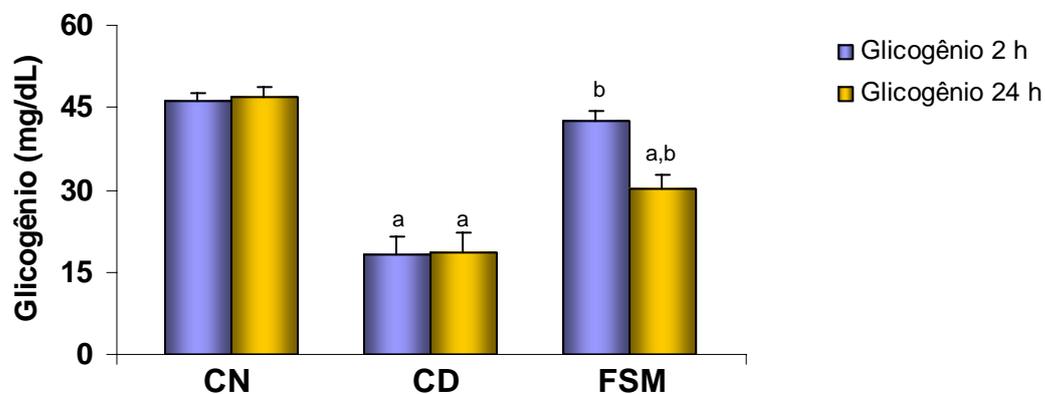


Figura 31 - Efeito da FSM sobre o glicogênio hepático de ratos diabéticos

O tratamento dos animais com a FSM (100 mg/kg,v.o.) foi iniciado 48 h após a indução do diabetes com ALX (40 mg/kg,i.v.). O glicogênio foi determinado após 10 dias de tratamento. O grupo CD= Controle diabético foi tratado apenas com ALX e água destilada; o grupo CN= Controle normal foi tratado apenas com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 10 animais por grupo. ^ap < 0,05 em relação ao grupo CN; ^bp < 0,05 em relação ao grupo CD.

3.15 Avaliação da FSM, TIR e GLI na hiperglicemia induzida por DZ em ratos

Com o objetivo de esclarecer o mecanismo de ação da FSM, resolvemos avaliar seus efeitos, utilizando o DZ, um antagonista da GLI, conhecido por reverter seus efeitos.

A **Tabela 13** mostra o efeito da FSM (100 mg/kg,v.o.) e TIR (2mg/kg,v.o) e GLI (5mg/kg,v.o.) administrados sozinhos e associados com a droga hiperglicemiante DZ (60 mg/kg,i.p.). Os resultados mostram que o DZ(60 mg/kg) aumentou a glicemia dos ratos nos em 28, 67 e 113 % ($116,2 \pm 5,24$; $164,2 \pm 17,01$ e $211,2 \pm 16,90$ mg/dL, n=6) nos tempos 30, 60 e 120 min quando comparados com os controles ($91,0 \pm 3,72$; $98,3 \pm 6,64$ e $99,0 \pm 5,36$ mg/dL, n=6). A FSM (100 mg/kg,) e a TIR (2mg/kg) sozinhas mantiveram a glicemia dentro dos níveis normais nos tempos 30 ($85,83 \pm 4,18$ e $88,5 \pm 3,40$) , 60 ($86,5 \pm 3,69$ e $109,2 \pm 5,50$) e 120 min ($102,7 \pm 5,32$; $115,5 \pm 4,37$) mas quando associadas com o DZ (60 mg/kg,) não conseguiram reverter a sua hiperglicemia, mas mantiveram os níveis glicêmicos elevados no tratamento com a FSM: 23, 50 e 105% ($112,2 \pm 6,02$; $147,3 \pm 4,29$ e $203,3 \pm 9,60$ mg/dL) e TIR: 28, 68 e 124 % ($117,0 \pm 6,57$; $166,1 \pm 21,1$ e $221,7 \pm 35,42$ mg/dL, n=6) quando comparados com os controles ($91,0 \pm 3,72$; $98,3 \pm 6,64$ e $99,0 \pm 5,36$ mg/dL, n=6).

A droga padrão GLI (5mg/kg) sozinha manteve os níveis glicêmicos normais nos tempos 30 ($67,3 \pm 3,16$), 60 ($65,8 \pm 5,06$), 90 ($60,7 \pm 5,54$) e 120 min ($70,5 \pm 6,41$ mg/dL) e quando associada com DZ(60 mg/kg,) protegeu os animais da hiperglicemia causada pelo mesmo. As reduções foram de 36, 40 e 48 % ($74,0 \pm 7,75$; $99,0 \pm 9,79$ e $110,0 \pm 14,43$ mg/dL, n=6) nos tempos 30, 60 e 120 min quando comparada com os respectivo controles ($116,2 \pm 5,24$; $164,2 \pm 17,01$ e $211,2 \pm 16,90$ mg/dL, n=6) . Os resultados sugerem que a atividade hipoglicemiante da FSM e TIR ocorra por mecanismo de ação diferente da glibenclamida. A partir daí, resolvemos investigar a ação de outro hipoglicemiante oral, no caso a metformina e sua associação com a TIR.

Tabela 13 - Avaliação da Fração Solúvel em Metanol de *Cissus verticillata* (FSM), Tiramina (TIR) e Glibenclamida (GLI) na curva glicêmica com diazóxido em ratos

Grupos (mg/kg,v.o)	Tempo (min) (Média ± EPM)			
	0	30	60	120
C N	88,5 ± 2,55	91,0 ± 3,72	98,3 ± 6,64	99,0 ± 5,36
DZ 60	63,4 ± 3,27	116,2 ± 5,24	164,2 ± 17,01 ^a	211,2 ± 16,90 ^a
FSM 100	67,3 ± 1,78	85,83 ± 4,18	86,5 ± 3,69	102,7 ± 5,32
FSM 100 + DZ 60	55,7 ± 1,80	112,2 ± 6,02	147,3 ± 4,29 ^a	203,3 ± 9,60 ^a
TIR 2	107,0 ± 3,30	88,5 ± 3,40	109,2 ± 5,50	115,5 ± 4,37
TIR 2 + DZ 60	62,2 ± 3,63	117,0 ± 6,57	166,1 ± 21,1 ^a	221,7 ± 35,42 ^a
GLI 5	67,3 ± 3,16	65,8 ± 5,06 ^b	60,7 ± 5,54 ^b	70,5 ± 6,41 ^b
GLI 5 + DZ 60	76,0 ± 3,73	74,0 ± 7,75 ^b	99,0 ± 9,79 ^b	110,0 ± 14,43 ^b

Os valores representam a Média ± EPM de 6 animais por grupo. A glicemia foi avaliada antes (Tempo = 0) de ratos em jejum de 12 horas. Logo em seguida os animais foram pré-tratados por via oral com a FSM (100 mg/kg), TIR (2 mg/kg) e GLI (5 mg/kg) e 30 minutos depois foram tratados com diazóxido 60 mg/kg,i.p. A glicemia foi medida nos tempos 30, 60, e 120 minutos após a administração das drogas sozinhas ou associadas com diazóxido 60 mg/kg,i.p.(DZ 60). ^ap<0,05 em relação ao respectivo controle normal (CN) de cada tempo e ^bp<0,05 em relação ao DZ 60 (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*).

3.16 Avaliação da glicemia, colesterol total, triglicerídios e VLDL, em ratos diabéticos tratados a TIR e MET e sua associação (MET + TIR)

A **Tabela 14** mostra a avaliação da glicemia em ratos diabéticos antes do tratamento (48 horas após a injeção de ALX (40 mg/kg,i.v) e depois do tratamento de 5 dias com TIR (1 mg/kg,v.o.) e MET (50 mg/kg,v.o). Os animais controle normal (tratados somente com água destilada) não sofreram alteração da glicemia após os 5 dias de tratamento. Já os animais controle diabético (tratados com ALX 40 mg/kg) aumentaram a glicemia de $72,9 \pm 2,30$ mg/dL para $328,2 \pm 22,02$ mg/dL, 48 h após a indução com aloxano) e esta glicemia permaneceu elevada após 5 dias de tratamento ($335,1 \pm 18,87$). A TIR nas doses de 1 e 2 mg/kg causou uma redução de 35 e 43% ($211,3 \pm 15,23$ e $148,0 \pm 28,55$ mg/dL) quando comparada com os respectivos controles ($324,7 \pm 18,12$, n=17 e $259,5 \pm 17,57$ mg/dL, n=11)) enquanto que a droga padrão MET 50 mg/kg causou uma redução da glicemia de 49 % ($160,6 \pm 23,82$ mg/dL) quando comparada com o controle ($315,6 \pm 18,70$ mg/dL). A associação TIR 1 + MET 50 e TIR 2 + MET 50 causou uma redução na glicemia de 66 e 73 % ($105,9 \pm 17,12$ e $111,3 \pm 27,93$ mg/dL), quando comparada com os respectivos controles ($308,0 \pm 24,03$, n=08 e $409,8 \pm 27,92$, n=08) mostrando que a associação de TIR+MET leva a uma tendência a potenciação, aproximando a glicemia dos valores normais.

Com relação ao colesterol total, observamos que os animais tratados com aloxano 40 mg/kg,i.v, não alteraram de modo significativo os níveis de colesterol total nos controles diabéticos ($71,0 \pm 3,05$ e $64,7 \pm 3,14$, n=18), quando comparados com os controles normais ($61,7 \pm 3,27$; $72,2 \pm 1,79$ mg/dL, n=20) antes e após o tratamento com água destilada.

Os resultados com a TIR nas doses de 1 e 2 mg/kg causou reduções do colesterol de 22 e 28% ($52,3 \pm 4,17$ e $47,3 \pm 1,69$ mg/dL) quando comparadas com os respectivos controles ($67,3 \pm 3,25$ e $66,1 \pm 3,07$ mg/dL). Já a droga padrão MET (50 mg/kg) causou uma redução do colesterol de 37 % ($44,5 \pm 2,84$ mg/dL) quando comparada com o seu respectivo controle ($71,0 \pm 4,72$ mg/dL). A associação TIR 1 + MET 50 causou uma redução do colesterol de 34 % ($52,4 \pm 6,50$ mg/dL)) quando comparada com o controle ($79,4 \pm 7,87$), mostrando que não houve uma potencialização quando administradas juntas. Enquanto que a associação TIR 2 + MET 50 redução do colesterol de 26 % ($47,3 \pm 2,34$ mg/dL) quando comparada com o seu controle ($63,7 \pm 3,98$ mg/dL), **Tabela 15**.

A **Tabela 16** mostra a avaliação dos triglicerídios e VLDL em ratos diabéticos antes do tratamento (48 horas após a injeção de aloxano 40 mg/kg,i.v) e depois do

tratamento de 5 dias com TIR (1 mg/kg,v.o.) e MET (50 mg/kg,v.o.). Os animais controle normal (tratados somente com água destilada) não sofreram alteração dos triglicerídios após os 5 dias de tratameto. Já os animais controle diabético (tratados com aloxano 40 mg/kg) aumentaram os triglicerídios de $64,9 \pm 9,17$ para $140,8 \pm 11,89$ mg/dL. A TIR nas doses de 1 e 2 mg/kg causou reduções dos triglicerídios e VLDL de 51 e 54 % ($89,4 \pm 8,77$ e $17,9 \pm 1,75$; $70,6 \pm 10,62$ e $14,1 \pm 2,13$ mg/dL) quando comparadas com os respectivos controles ($181,4 \pm 14,44$ e $36,3 \pm 2,89$; $154,0 \pm 11,70$ e $30,8 \pm 2,34$ mg/dL). Já a droga padrão MET 50 mg/kg causou uma redução dos triglicerídios e VLDL de 48 % ($79,7 \pm 5,62$ e $16,0 \pm 1,12$ mg/dL) quando comparada com os seus respectivos controles ($152,8 \pm 15,11$ e $30,6 \pm 3,02$ mg/dL)

A associação TIR 1 + MET 50 e TIR 2 + MET 50 causou reduções dos triglicerídios e VLDL de 43 e 63 % ($92,1 \pm 9,23$ e $18,4 \pm 1,86$; $76,6 \pm 5,24$ e $15,3 \pm 1,05$ mg/dL) quando comparadas com os controles ($166,8 \pm 14,13$ e $33,4 \pm 2,83$; $209,3 \pm 13,38$ e $41,9 \pm 2,68$ mg/dL). Observamos, destes resultados com TIR 1 e 2, que os valores das reduções dos triglicerídios são semelhantes aos resultados obtidos com a droga padrão MET e compatíveis aos valores normais dos triglicerídios.

Tabela 14 - Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre a glicemia de ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	Glicemia(mg/dL)	
	Antes	Depois
CN	$72,9 \pm 2,30$ (08)	$80,8 \pm 3,37$
CD	$328,2 \pm 22,02^a$ (18)	$335,1 \pm 18,87^a$
TIR 1	$324,7 \pm 18,12^a$ (17)	$211,3 \pm 15,23^{a,b}$
TIR 2	$259,5 \pm 17,57^a$ (11)	$148,0 \pm 28,55^b$
MET 50	$315,6 \pm 18,70^a$ (14)	$160,6 \pm 23,82^b$
MET 50 + TIR 1	$308,0 \pm 24,03^a$ (08)	$105,9 \pm 17,12^b$
MET 50 + TIR 2	$409,8 \pm 27,92^a$ (08)	$111,3 \pm 27,93^b$

A glicemia foi medida no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com Tiramina 1 e 2 mg/kg (TIR 1 e 2) e Metformina 50 mg/kg (MET 50) e as associações MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2,

via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM do número de animais entre parêntese. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

Tabela 15 - Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre o colesterol total de ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	Colesterol Total(mg/dL)	
	Antes	Depois
CN	61,7 \pm 3,27 (20)	72,2 \pm 1,79
CD	71,0 \pm 3,05 (18)	64,7 \pm 3,14
TIR 1	67,6 \pm 3,25 (15) ^a	52,3 \pm 4,17
TIR 2	66,1 \pm 3,07 (11) ^a	47,3 \pm 1,69 ^b
MET 50	71,0 \pm 4,72 (14) ^a	44,5 \pm 2,84 ^b
MET 50 + TIR 1	79,4 \pm 7,87 (08) ^a	52,4 \pm 6,50 ^b
MET 50 + TIR 2	63,7 \pm 3,98 (08) ^a	47,3 \pm 2,34 ^b

O colesterol total foi medida no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com Tiramina 1 e 2 mg/kg (TIR 1 e 2) e Metformina 50 mg/kg (MET 50) e as associações MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2, via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média \pm EPM do número de animais entre parênteses. ^a $p < 0,05$ quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^b $p < 0,05$ quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

Tabela 16 - Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os triglicerídios e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) de ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	Triglicerídios (mg/dL)		VLDL (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
CN	64,9 ± 9,17 (12)	79,8 ± 10,25	12,8 ± 1,74 (12)	16,0 ± 2,05
CD	140,8 ± 11,89 (15) ^a	106,0 ± 9,33 ^a	28,2 ± 2,38 (15) ^a	21,2 ± 1,87
TIR 1	181,4 ± 14,44 (17) ^a	89,4 ± 8,77 ^b	36,3 ± 2,89 (17) ^a	17,9 ± 1,75 ^b
TIR 2	154,0 ± 11,70 (11) ^a	70,6 ± 10,62 ^b	30,8 ± 2,34 (11) ^a	14,1 ± 2,13 ^b
MET 50	152,8 ± 15,11 (14) ^a	79,7 ± 5,62 ^b	30,6 ± 3,02 (14) ^a	16,0 ± 1,12 ^b
MET 50 + TIR 1	166,8 ± 14,13 (08) ^a	92,1 ± 9,23 ^b	33,4 ± 2,83 (08) ^a	18,4 ± 1,86 ^b
MET 50 + TIR 2	209,3 ± 13,38 (08) ^a	76,6 ± 5,24 ^b	41,9 ± 2,68 (08) ^a	15,3 ± 1,05 ^b

Os triglicerídios e VLDL foram medidos no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com Tiramina 1 e 2 mg/kg (TIR 1 e 2) e Metformina 50 mg/kg (MET 50) e as associações MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2, via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média ± EPM do número de animais entre parênteses. ^a p<0,05 quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.17 Avaliação dos níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos tratados com a TIR e MET e sua associação (MET + TIR)

A **Tabela 17** mostra o efeito da MET (50 mg/kg, v.o.) e TIR (1 e 2 mg/kg, v.o.) e suas associações (TIR 1 + MET 50 e TIR 2 + MET 50) sobre os níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos induzidos por ALX 40 mg/kg, i.v.).

Os resultados mostram que houve aumento significativo nos níveis séricos de Uréia de $19,6 \pm 0,56$ para $49,7 \pm 3,44$, n=12) no grupo CD (48 h após ALX) e estes valores permaneceram alterados 5 dias após o tratamento sendo de $42,6 \pm 6,27$, n=12).

A TIR (1 mg/kg, v.o.) causou uma redução dos níveis de Uréia de 26 % ($31,0 \pm 4,60$ mg/dL) quando comparada com o seu controle ($42,0 \pm 4,74$ mg/dL). Curiosamente, a TIR (2 mg/kg, v.o.) não teve efeito sobre este níveis. Já a droga padrão MET (50 mg/kg,v.o) causou uma redução de 31 % ($26,3 \pm 3,13$ mg/dL) quando comparada com o seu controle ($37,9 \pm 4,41$ mg/dL)

Da mesma forma que a MET (50 mg/kg, v.o.) e TIR (1 mg/kg, v.o.) sozinhas reduziram os níveis de uréia, a sua associação (MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2) causou um aumento nesta redução de 50 e 43 % ($26,0 \pm 2,05$, n=08 e $16,3 \pm 3,24$ mg/dL, n=07 quando comparados com os respectivos controles ($51,8 \pm 1,81$ e $28,5 \pm 3,47$ mg/dL).

Com relação aos níveis de creatinina observamos que houve aumento ($0,4 \pm 0,03$ para $3,1 \pm 0,16$ mg/dL, n=12), no grupo CD (48 h após ALX) e esses valores permaneceram alterados 5 dias após o tratamento ($2,5 \pm 0,10$ mg/dL, n=12).

A MET 50 mg/kg,v.o reduziu em 52 % ($1,5 \pm 0,07$, n=16) os níveis de creatinina quando comparados com o controle ($3,1 \pm 0,14$ mg/dL). Já a TIR (1e 2 mg/kg,v.o.) reduziu em 27 ($1,9 \pm 0,16$, n=13) e 39 % ($1,4 \pm 0,20$, n=6) quando comparados com os respectivos controles ($2,6 \pm 0,19$ e $2,3 \pm 0,32$ mg/dL). A associação MET 50 + TIR 1 reduziu os níveis de creatinina em 57 % ($1,3 \pm 0,12$, n=8) quando comparados com o seu controle ($3,0 \pm 0,09$ mg/dL), mostrando que não houve potenciação, já que a redução com MET (50 mg/kg), foi de 52 % e com a TIR (1 mg/kg) foi de 27 %. Da mesma forma, a associação MET 50 + TIR 2 não potencializou a redução dos níveis de creatinina, sendo somente de 32 % ($2,1 \pm 0,27$, n=5) quando comparados com o seu respectivo controle ($3,1 \pm 0,24$ mg/dL).

Tabela 17 - Efeito da Tiramina (TIR), Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os níveis séricos de uréia e creatinina em ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	Uréia (mg/dL)		Creatinina (mg/dL)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
CN	19,6 ± 0,56 (12)	21,1 ± 0,88	0,4 ± 0,03 (14)	0,4 ± 0,03
CD	49,7 ± 3,44 (12) ^a	42,6 ± 6,27	3,1 ± 0,16 ^a (12)	2,5 ± 0,10 ^a
TIR 1	42,0 ± 4,74 (12) ^a	31,0 ± 4,60 ^b	2,6 ± 0,19 ^a (13)	1,9 ± 0,16 ^b
TIR 2	59,0 ± 2,07 (06) ^a	49,7 ± 3,44	2,3 ± 0,32 ^a (06)	1,4 ± 0,20 ^b
MET 50	37,9 ± 4,41 (12) ^a	26,3 ± 3,13 ^b	3,1 ± 0,14 ^a (16)	1,5 ± 0,07 ^b
MET 50 + TIR 1	51,8 ± 1,81 (08) ^a	26,0 ± 2,05 ^b	3,0 ± 0,09 ^a (08)	1,3 ± 0,12 ^b
MET 50 + TIR 2	28,5 ± 3,47 (07) ^a	16,3 ± 3,24 ^b	3,1 ± 0,24 ^a (05)	2,1 ± 0,27 ^b

A Uréia e a Creatinina foram medidas no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com a TIR (1 e 2 mg/kg), MET (50 mg/kg) e as associações: MET (50mg/kg) + TIR (1 mg/kg) ou MET (50 mg/kg) + TIR (2 mg/kg) via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média ± EPM de 6-15 animais por grupo. ^a p<0,05 quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.18 Determinação dos níveis séricos das enzimas AST e ALT em ratos diabéticos tratados com TIR e MET e sua associação (MET + TIR)

A **Tabela 18** mostra que os níveis de AST com TIR 1 mg/kg foram reduzidos em 24 % ($55,6 \pm 5,30$ U/L) quando comparados com o seu controle ($73,4 \pm 4,20$ U/L) enquanto a TIR 2 mg/kg não mostrou redução significativa. Uma redução acentuada de 40 % ($44,6 \pm 4,76$) ocorreu com a MET 50 mg/kg quando comparado com o seu respectivo controle ($74,8 \pm 5,34$ U/L),

Da mesma forma as associações MET 50 +TIR 1 mg/kg e MET 50 +TIR 2 mg/kg causaram reduções de 35 % ($48,2 \pm 3,73$) e 49 % ($40,0 \pm 3,15$ U/L) quando comparadas com os seus respectivos controles ($74,0 \pm 7,44$ e $78,8 \pm 9,05$ U/L).

Os níveis de ALT não foram alterados nos animais controle diabético(CD) 48 horas e 5 dias após o tratamento com aloxano 40 mg/kg,i.v ($43,5, \pm 3,65$ e $52,9 \pm 4,84$, n=24) quando comparados com o grupo controle normal antes e após o tratamento de 5 dias ($49,2 \pm 4,32$ e $48,9 \pm 4,24$, n= 10) . A TIR 1 e TIR 2 também não alteraram os valores de ALT, sendo antes do tratamento ($46,0 \pm 3,15$ e $52,3 \pm 4,06$, n=21) e depois ($38,0 \pm 2,82$ e $45,3 \pm 4,41$). A MET 50 também não alterou os níveis de ALT sendo os valores, antes do tratamento ($40,0 \pm 1,97$, n-14) e depois do tratamento ($33,2 \pm 1,91$). Conseqüentemente, as associações MET 50 + TIR 1 e MET 50 + TIR 2 não alteraram os valores de ALT, sendo antes do tratamento ($33,2 \pm 1,36$, n=11 e $34,8 \pm 2,19$, n=5) e depois do tratamento ($31,8 \pm 1,88$ e $29,1 \pm 3,57$).

Tabela 18 - Efeito da Tiramina (TIR) e Metformina (MET) e a sua associação (MET + TIR) sobre os níveis séricos das enzimas aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) de ratos diabéticos

Grupos (mg/kg,v.o)	AST (U/L)		ALT (U/L)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
CN	86,0 ± 4,04 (16)	70,4 ± 2,75	49,2 ± 4,32 (10)	48,9 ± 4,24
CD	89,0 ± 5,65 (24)	73,2 ± 7,94	43,5 ± 3,65 (10)	52,9 ± 4,84
TIR 1	73,4 ± 4,20 (14)	55,6 ± 5,30 ^b	46,0 ± 3,15 (21)	38,0 ± 2,82
TIR 2	86,9 ± 10,19 (08)	83,9 ± 13,44	52,3 ± 4,06 (12)	45,3 ± 4,41
MET 50	74,8 ± 5,34 (16)	44,6 ± 4,76 ^{a,b}	40,0 ± 1,97 (14)	33,2 ± 1,91
MET 50 + TIR 1	74,0 ± 7,44 (11)	48,2 ± 3,73 ^{a,b}	33,2 ± 1,36 (11)	31,8 ± 1,88
MET 50 + TIR 2	78,8 ± 9,05 (05)	40,0 ± 3,15 ^{a,b}	34,8 ± 2,19 (05)	29,1 ± 3,57

Os níveis séricos de AST e ALT foram medidas no soro de ratos controle normal (CN) e controle diabético (CD) antes e depois do tratamento com água destilada ou com TIR (1 mg/kg) e MET (50 mg/kg) e as associações MET (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) e MET (50 mg/kg) + TIR (2mg/kg), via oral por 5 dias. O tratamento dos animais iniciou 48 h após a indução da hiperglicemia com aloxano. O grupo controle normal (CN) foi tratado apenas com água. Os valores representam a média ± EPM de 5-16 animais por grupo. ^a p<0,05 quando comparado com CN(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*); ^bp < 0,05 quando comparado com o mesmo grupo antes do tratamento (Teste “t” pareado).

3.19 Avaliação Final de Peso e Mortalidade em ratos diabéticos tratados com a FSM, FRT), TIR, GLI e MET

Na **Tabela 19** observamos que os animais Controle diabético (CD) tratados com aloxano 40 mg/kg,i.v. apresentaram uma variação de peso de 9,5 % ($201,0 \pm 4,20$) quando comparado com o peso inicial ($222,1 \pm 4,00$ g), e uma mortalidade em torno de 31 %. Já a FSM (50 mg/kg) apresentou uma variação de peso de 6,5% ($178,5 \pm 6,79$) quando comparada com o controle ($191,3 \pm 8,20$ g), entretanto apesar de uma pequena perda de peso, a mortalidade com esta dose foi alta e de 38%. Já a FSM (100 mg/kg) causou uma pequena redução de peso que não foi significativa, sendo de 1,7 % ($197,3 \pm 7,02$) quando comparada com o seu controle ($200,7 \pm 6,25$ g), bem como um baixo índice de mortalidade, em torno de 18 %.

A FRT (100 mg/kg) causou uma redução significativa de peso que foi em torno de 10,4 % ($163,1 \pm 4,19$) quando comparada com o seu controle ($182,1 \pm 5,30$ g) e uma mortalidade de 28 %, sendo mais baixa do que o CD. Já a TIR (1, 2, 4 mg/kg) causou pequenas, mas significativas reduções de peso de 7,5 ($211,1 \pm 6,91$) ; 6,8 ($203,3 \pm 5,09$) e 6,4 % ($209,0 \pm 6,46$ g) quando comparada com os respectivos controles ($228,3 \pm 7,79$; $218,1 \pm 5,95$; $223,2 \pm 8,01$ e uma mortalidade de 39, 39 e 44 %, considerada alta quando comparada com o grupo CD (31 %)

A GLI (2,5 mg/kg,.) causou um redução significativa de peso de 13 % ($197,0 \pm 7,72$) quando comparada com o seu controle ($226,4 \pm 1,47$ g) e uma mortalidade de 44 %. Ao contrário da dose anterior, a GLI (5 mg/kg,.) não causou redução significativa de peso, mas a taxa de mortalidade foi de 38 %.

A MET (50 e 100 mg/kg,v) causou reduções semelhantes e de 11 e 10 % ($206,6 \pm 5,81$ e $198,0 \pm 5,29$ g), entretanto apresentou um alto percentual de mortalidade com a dose de 100 mg/kg, sendo de 57 % enquanto que a dose de 50 mg/kg causou uma mortalidade de 16 %, evidenciando que esta dose, entre as duas deve ser a preferida para o tratamento de animais diabéticos.

A associação FSM (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) causou um pequena, mas significativa redução de peso que foi de 5 % ($206,9 \pm 10,25$), quando comparada com o seu controle $217,3 \pm 5,69$ g), entretanto causou uma alto índice de mortalidade de 50 %, mostrando que juntas potenciam a mortalidade delas separadas.

Já a associação GLI (5 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) causou uma pequena redução de peso, sendo de 6 % ($231,0 \pm 8,29$) quando comparada com o seu controle ($245,1 \pm 7,93$ g). A

mortalidade também foi baixa e de 20 %, mostrando uma reversão dos efeitos da TIR e GLI sozinha.

A associação MET (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) causou uma redução de peso de 7 % ($182,4 \pm 5,61$), quando comparada com o seu controle ($196,3 \pm 3,22$ g) e uma baixa mortalidade que foi de 21 %. Entretanto a MET (50 mg/kg) + TIR (2 mg/kg) causou o dobro da redução de peso, sendo de 14,6 % ($215,6 \pm 4,93$) quando comparada com o seu controle ($252,6 \pm 7,87$ g) e o dobro da mortalidade que foi de 44 %, mostrando que a associação MET (50 mg/kg) + TIR (1 mg/kg) deve ser a preferida no tratamento de animais diabéticos devido a pequena redução de peso e baixa mortalidade.

Tabela 19 – Avaliação de peso e mortalidade de ratos diabéticos tratados com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Fração Rica em Tiramina (FRT), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e as associações (FSM + TIR; GLI + TIR; MET + TIR).

Grupos	Dose (mg/Kg,v.o)	Pesos (g) (Média ± EPM)		Peso (%)	Nº de animais		Morte (%)
		Inicial	Final		Inicial	Final	
CD	-	222,1 ± 4,00	201,0 ± 4,20 ^a	9,5	58	40	31
FSM	50	191,3 ± 8,20	178,5 ± 6,79 ^a	6,7	34	21	38
	100	200,7 ± 6,25	197,3 ± 7,02	1,7	22	18	18
FRT	100	182,1 ± 5,30	163,1 ± 4,19 ^a	10,4	14	10	28
TIR	1	228,3 ± 7,79	211,1 ± 6,91 ^a	7,5	43	24	39
	2	218,1 ± 5,95	203,3 ± 5,09 ^a	6,8	27	15	39
	4	223,2 ± 8,01	209,0 ± 6,46	6,4	16	09	44
GLI	2,5	226,4 ± 1,47	197,0 ± 7,72 ^a	13	09	05	44
	5,0	194,6 ± 5,72	191,7 ± 6,56	1,5	37	21	38
MET	50	232,0 ± 5,14	206,6 ± 5,81 ^a	11	19	16	16
	100	220,0 ± 4,16	198,0 ± 5,29 ^a	10	07	03	57
FSM + TIR	50 + 1	217,3 ± 5,69	206,9 ± 10,25 ^a	5,0	18	09	50
GLI + TIR	5 + 1	245,1 ± 7,93	231,0 ± 8,29 ^a	6,0	20	16	20
MET + TIR	50 + 1	196,3 ± 3,22	182,4 ± 5,61 ^a	7,0	14	11	21
	50 + 2	252,6 ± 7,87	215,6 ± 4,93 ^a	14,6	18	10	44

Os animais foram pesados no início e final do experimento após o tratamento de 5 dias. A mortalidade foi avaliada em % do número inicial e final de animais. Os valores representam a Média ± EPM do peso inicial (48 h após aloxano) e final (5 dias após aloxano).
^ap<0,05 em relação ao peso inicial.

3.20 Avaliação da Atividade Analgésica da FSM, GLI, TIR e da associação (FSM + TIR) no teste da formalina em camundongos

Tendo em vista que trabalhos anteriores têm mostrado atividade antiinflamatória do extrato aquoso da planta e que níveis elevados de marcadores inflamatórios aumentam o risco de diabetes, resolvemos avaliar a atividade analgésica da FSM, TIR e GLI no teste da formalina que avalia a dor em duas fases: 1ª fase (dor neurogênica) e 2ª fase (dor inflamatória).

A administração da Fração Solúvel em Metanol 50 e 100 mg/kg (FSM 50 e 100) não demonstrou efeito na 1ª fase da dor no teste da formalina, Entretanto, na 2ª fase da dor FSM 50 e 100 inibiram em 46% ($13,3 \pm 3,69$, n=14) e 48 % ($12,7 \pm 2,25$ s, n=14) quando comparada com o controle ($24,6 \pm 3,48$ s, n=22). Já a GLI 5 não teve efeito analgésico em ambas as fases (**Figura 32**).

A Tiramina 1 mg/kg não teve efeito analgésico na 1ª fase da dor ($40,8 \pm 4,91$, n=12) quando comparado com o controle ($42,1 \pm 2,21$, n=22) Já na 2ª fase houve inibição significativa no tempo de lambertura das patas sendo de 49 % ($12,6 \pm 3,62$, n=12) quando comparada com o seu controle ($24,6 \pm 2,80$ s, n=22). Doses maiores de TIR (2 e 4 mg/kg) causaram inibições na 1ª fase sendo de 37% ($26,4 \pm 2,54$, n=12) e 44% ($23,4 \pm 2,20$, n=10) quando comparadas com o seu controle ($42,1 \pm 2,21$, n=22), enquanto que na 2ª fase as inibições foram maiores, sendo de 54% ($11,4 \pm 2,28$, n=12) e 61 % ($9,7 \pm 2,89$, n=10) quando comparadas com o seu controle ($24,6 \pm 2,80$ s, n=22). Da mesma forma a droga analgésica padrão morfina 10 mg/kg causou um inibição significativa na 1ª fase da dor neurogênica, sendo de 54% ($19,3 \pm 4,2$) e na 2ª fase da dor inflamatória, sendo de 90% ($2,6 \pm 1,8$ s), quando comparadas com o seu controle na 1ª ($42,1 \pm 2,21$) e na 2ª fase ($26,4 \pm 2,54$, n=10) **Figura 33**.

A associação FSM + TIR , da mesma forma que FSM e TIR sozinha não teve efeito na 1ª fase da dor. Já na 2ª fase da dor FSM 50 e TIR 1 sozinhas inibiram a dor em 46 ($13,3 \pm 3,69$, n=14) e 49% ($12,6 \pm 3,62$, n=12) quando comparadas com os respectivos controles ($24,6 \pm 2,80$ s, n=22) . Este efeito foi dobrado quando as duas doses foram associadas (FSM + TIR) sendo significativo e de 78% ($5,3 \pm 0,3$ s, n=10) quando comparada com o seu controle ($24,6 \pm 2,80$ s, n=10), **Figura 34**.

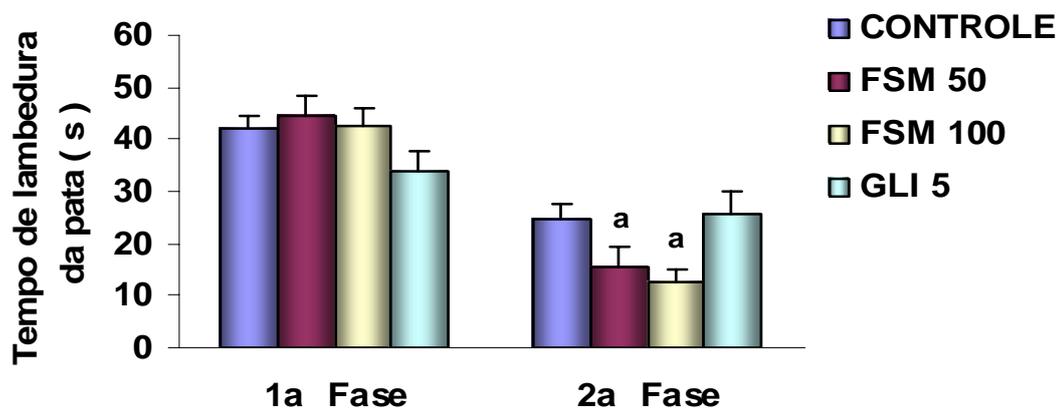


Figura 32 - Atividade analgésica da Fração Solúvel em Metanol (FSM) e Glibenclamida (GLI) no Teste da Formalina em camundongos

Os camundongos foram tratados por via oral com a FSM (50 e 100 mg/kg) ou GLI (5 mg/kg) e 1 hora depois foi administrado formalina a 1 % (20 μ l/pata s.c) na pata traseira direita, sendo em seguida avaliados na 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (20-25 min) da nocicepção. O grupo controle foi tratado com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 12-22 animais por grupo. ^ap < 0,05 em relação ao controle(ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*.

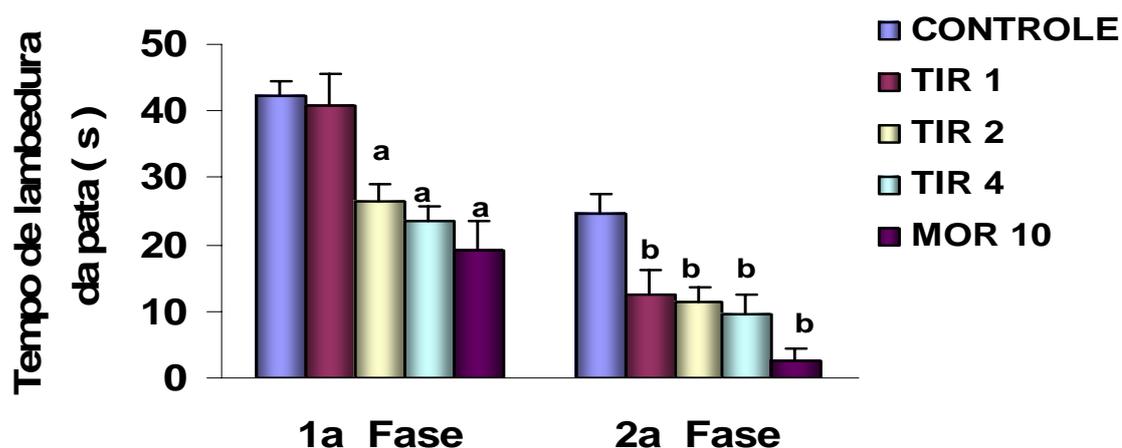


Figura 33 - Atividade analgésica da Tiramina (TIR) e Morfina (MOR) no teste da Formalina em camundongos

Os camundongos foram tratados com a TIR (1, 2 e 4 mg/kg, v.o.) ou MOR (10 mg/kg, s.c.) e 1 hora ou 30 min depois foi administrado formalina a 1 % (20 μ l/pata s.c) na pata traseira direita, sendo em seguida avaliados na 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (20-25 min) da nocicepção. O grupo controle foi tratado com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM do tempo de lambertura da pata de 10-22 animais por grupo. ^a $p < 0.05$ em relação ao controle da 1ª fase e ^b $p < 0,05$ em relação ao controle da 2ª fase (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*).

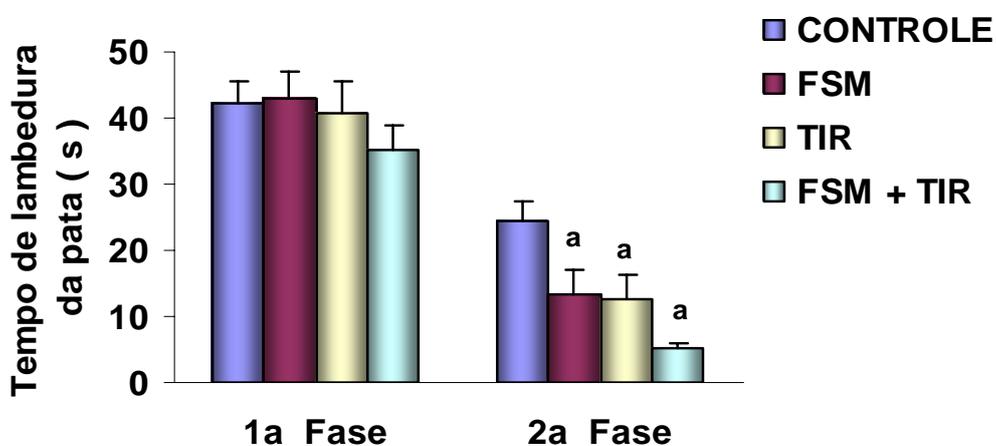


Figura 34 - Atividade analgésica da Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e a associação (FSM + TIR) no Teste da Formalina em camundongos

Os camundongos foram tratados por via oral com a FSM (50 mg/kg), TIR (1 mg/kg) e a associação (FSM + TIR) e 1 hora depois foi administrado formalina a 1 % (20 μ l/pata, s.c) na pata traseira direita, sendo em seguida avaliados na 1ª fase (0-5 min) e 2ª fase (20-25 min) da nocicepção. O grupo controle foi tratado com água destilada. Os valores representam a média \pm EPM de 10-12 animais por grupo. ^a $p < 0.05$ em relação ao controle na 2ª fase (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*).

3.21 Avaliação da Atividade antiedematogênica da FSM, TIR e GLI no edema de pata induzido por carragenina e dextrano em camundongos e ratos

Já que a FSM e TIR demonstraram potente efeito analgésico na 2ª fase da dor inflamatória, resolvemos avaliar a atividade antiedematogênica no edema de pata induzido por carragenina e dextrano.

A FSM 50 e 100, bem como a GLI e a TIR 2 e 4 mg/kg não tiveram efeito antiedematogênico no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Entretanto a TIR 1 mg/kg apresentou uma redução de 53% ($0,07 \pm 0,007$, n=8) do edema somente após 24 h de tratamento quando comparado com o respectivo controle ($0,15 \pm 0,0015$ ml, n=15). Já a droga padrão Indometacina 5 mg/kg, v.o (INDO) reduziu o edema na 2ª ($0,08 \pm 0,014$), 3ª ($0,08 \pm 0,006$) e 4ª hora ($0,06 \pm 0,009$ ml) em 50, 56 e 60%, mantendo-se reduzido após 24ª horas ($0,03 \pm 0,007$ ml, n=6) com uma redução de 80%, quando comparados com os respectivos controles na 2ª ($0,16 \pm 0,014$), 3ª ($0,18 \pm 0,012$), 4ª ($0,15 \pm 0,006$) e 24ª hora ($0,15 \pm 0,015$ ml, n=15), **Tabela 20**

Em ratos a FSM 50, TIR 1, 2 e 4 mg/kg não reduziram o edema induzido por carragenina, entretanto FSM 100 teve uma significativa redução do edema de 21% na 3ª ($1,12 \pm 0,084$), 21% na 4ª ($1,14 \pm 0,082$) e de 46% na 24ª hora ($0,27 \pm 0,059$ ml, n=8) quando comparados com os respectivos controles na 3ª ($1,43 \pm 0,099$), 4ª ($1,45 \pm 0,079$) e 24ª hora ($0,50 \pm 0,041$ ml, n=15). Curiosamente a dose de FSM 200 não reduziu o edema (**Tabela 21 e 22**). Já a Indometacina reduziu o edema em 42% na 2ª ($1,09 \pm 0,133$), em 44% na 3ª ($1,38 \pm 0,136$) e 45% na 4ª hora ($1,49 \pm 0,139$ ml, n=6), quando comparados com os respectivos controles na 2ª ($1,88 \pm 0,210$), 3ª ($2,47 \pm 0,259$) e 4ª hora ($2,71 \pm 0,147$ ml), **Tabela 22**.

No edema de pata induzido por dextrano em camundongos e ratos a FSM, TIR e GLI não demonstraram atividade antiedematogênica em todas as doses testadas. A droga padrão ciproheptadina 5 mg/kg não reduziu o edema em camundongos (**Tabela 23**), entretanto na dose de 10 mg/kg reduziu de modo significativo o edema em ratos em 87% ($0,4 \pm 0,08$ ml) na 1ª, 84% ($0,7 \pm 0,08$), na 2ª, 79% ($0,9 \pm 0,05$) na 3ª, 82% ($0,7 \pm 0,09$ ml, n=7) e na 4ª hora quando comparados com os respectivos controles na 1ª ($3,0 \pm 0,23$), 2ª ($4,4 \pm 0,51$), 3ª ($4,2 \pm 0,37$) e na 4ª hora ($3,9 \pm 0,35$ ml, n=7), **Tabela 24**.

Tabela 20 – Avaliação do Edema de pata induzido por carragenina em camundongos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e Indometacina (INDO)

GRUPO / TEMPO (h)	Volume da Pata (ml) (Média ± EPM)				
	1	2	3	4	24
Controle	0,11 ± 0,008	0,16± 0,014	0,18 ±0 ,012	0,15 ± 0,006	0,15± 0,015
FSM 50	0,10 ± 0,015	0,17 ± 0,006	0,18 ± 0,008	0,15 ± 0,006	0,11 ± 0,013
FSM 100	0,11 ± 0,012	0,16± 0,011	0,16 ± 0,013	0,15± 0,014	0,13±0,014
TIR 1	0.09 ± 0.008	0.14 ± 0.011	0.17 ± 0.013	0.13 ± 0.013	0.07 ± 0.007 ^a
TIR 2	0.09 ± 0.008	0.14 ± 0.011	0.14 ± 0.008	0.12 ± 0.010	0.09 ± 0.009
TIR 4	0.06 ± 0.014	0.12 ± 0.007	0.12 ± 0.014	0.10 ± 0.008	0.10 ± 0.011
GLI 5	0,07 ± 0,009	0,12 ± 0,017	0,15 ± 0,016	0,16 ± 0,017	0,14 ± 0,024
INDO 5	0,05 ± 0,006	0,08 ± 0,014 ^a	0,08 ± 0,006 ^a	0,06 ± 0,009 ^a	0,03 ± 0 ,007 ^a

Os animais foram tratados com FSM (50 e 100mg/kg), TIR (1, 2 e 4 mg/kg) e GLI (5 mg/kg), INDO (5 mg/kg) (e água destilada (Controle) e 1 hora depois foram injetados com carragenina a 1%, 0,05ml/pata e em seguida o edema foi medido em pletismógrafo após 1, 2, 3, 4 e 24h da administração oral das respectivas drogas citadas. Os números representam média ± EPM de 6-15 animais por grupo. * p< 0.05 em relação ao controle. ANOVA e Student- Newman- Keuls como *post hoc*.

Tabela 21 – Edema de pata induzido por carragenina em ratos após tratamento com a Fração Solúvel em metanol (FSM)

GRUPO /TEMPO(h)	Volume da Pata (ml) (Média ± EPM)				
	1	2	3	4	24
Controle	0.39 ± 0.023	0.95 ± 0.077	1.43 ± 0.099	1.45 ± 0.079	0.50 ± 0.041
FSM 50	0.37 ± 0.042	0.76 ± 0.084	1.23 ± 0.099	1.36 ± 0.118	0.32 ± 0.050
FSM 100	0.36 ± 0.032	0.71 ± 0.059	1.12 ± 0.084*	1.14 ± 0.082*	0.27 ± 0.059 ^a
FSM 200	0.41 ± 0.022	1.14 ± 0.052	1.52 ± 0.093	1.61 ± 0.089	0.57 ± 0.062

Os animais foram tratados com a FSM 50 mg/kg (FSM 50, 100 e 100) e água destilada (Controle) e 1 hora depois foram injetados com carragenina a 1%, 0,1ml/pata e em seguida o edema foi medido em pletismógrafo após 1, 2, 3, 4 e 24h da administração das respectivas drogas citadas. Os números representam média ± EPM de 8-16 animais por grupo.

^a p < 0.05 em relação ao controle. ANOVA e Student- Newman- Keuls como *post hoc*

Tabela 22 – Avaliação do edema de pata induzido por carragenina em ratos após tratamento com a Tiramina (TIR) e Indometacina (INDO)

GRUPO/ TEMPO (h)	Volume da Pata (ml) (Média ± EPM)				
	1	2	3	4	24
Controle	0,87± 0,121	1,88 ± 0,210	2,47± 0,259	2,71± 0,147	0,80± 0,139
TIR 1	1,08± 0,059	1,95 ± 0,131	2,56± 0,141	2,94± 0,239	0,85± 0,131
TIR 2	1,12± 0,188	1,82 ± 0,335	2,46± 0,325	2,73± 0,325	0,88± 0,139
TIR 4	1,01 ± 0,097	2,00 ± 0,150	2,85± 0,218	2,67± 0,244	0,85± 0,164
INDO 5	0,89± 0,113	1,09 ± 0,133 ^a	1,38 ± 0,136 ^a	1,49 ± 0,139 ^a	0,92 ± 0,189

Os animais foram tratados com TIR (1, 2 e 4 mg/kg) e INDO (5 mg/kg) e água destilada 0,1 ml/10g (Controle) e 1hora depois foram injetados com carragenina a 1%, 0,1ml/pata e em seguida o edema foi medido em pletismógrafo após 1,2,3,4 e 24h da administração oral das respectivas drogas citadas. Os números representam média ± EPM de 6-7 animais por grupo. ^a p< 0.05 em relação ao controle. ANOVA e Student- Newman- Keuls como *post hoc*

Tabela 23 – Avaliação do edema de pata induzido por Dextrano em camundongos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR), Glibenclamida (GLI) e Ciproheptadina (CIPRO)

GRUPO/ TEMPO(h)	Volume da Pata (ml) (Média ± EPM)			
	1	2	3	4
Controle	0,09 ± 0,008	0,11 ± 0,007	0,11 ± 0,005	0,09 ± 0,009
FSM 50	0,12 ± 0,015	0,13 ± 0,013	0,13 ± 0,015	0,09 ± 0,013
FSM 100	0,09 ± 0,014	0,09 ± 0,015	0,09 ± 0,014	0,10 ± 0,011
TIR 1	0,09 ± 0,005	0,09 ± 0,007	0,11 ± 0,005	0,09 ± 0,010
TIR 2	0,09 ± 0,008	0,09 ± 0,007	0,10 ± 0,007	0,09 ± 0,009
TIR 4	0,12 ± 0,005	0,12 ± 0,010	0,11 ± 0,012	0,12 ± 0,005
GLI 5	0,10 ± 0,009	0,10 ± 0,009	0,10 ± 0,009	0,10 ± 0,011
CIPRO 5	0,06 ± 0,007	0,07 ± 0,014	0,06 ± 0,007	0,05 ± 0,006

Os animais foram tratados com a FSM (50 e 100 mg/kg), TIR (1, 2 e 4 mg/kg), GLI (5 mg/kg) CIPRO (5 mg/kg) e água destilada (Controle) e 1 hora depois foram injetados com dextrano a 1,5 %, 0,05ml/pata e em seguida o edema foi medido em pletismógrafo após 1, 2, 3 e 4 h da administração oral das respectivas drogas citadas. Os números representam média ± EPM de 6-12 animais por grupo.. ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc*. Os valores não foram significativamente diferentes do controle.

Tabela 24 – Avaliação do edema de pata induzido por Dextrano em ratos após tratamento com a Fração Solúvel em Metanol (FSM), Tiramina (TIR) e Ciproheptadina (CIPRO)

GRUPO/ TEMPO(h)	Volume da Pata (ml) (Edema ± EPM)			
	1	2	3	4
Controle	3,0 ± 0,23	4,4 ± 0,51	4,2 ± 0,37	3,9 ± 0,35
FSM 50	2,6 ± 0,28	3,6 ± 0,32	4,2 ± 0,25	3,2 ± 0,33
FSM 100	3,0 ± 0,17	3,5 ± 0,34	3,9 ± 0,33	3,5 ± 0,21
TIR 1	2,6 ± 0,28	3,5 ± 0,36	3,7 ± 0,45	2,9 ± 0,47
TIR 2	2,9 ± 0,22	4,3 ± 0,13	4,0 ± 0,13	3,7 ± 0,18
TIR 4	3,2 ± 0,29	4,3 ± 0,21	4,1 ± 0,24	3,4 ± 0,15
CIPRO 10	0,4 ± 0,08 ^a	0,7 ± 0,08 ^a	0,9 ± 0,05 ^a	0,7 ± 0,09 ^a

Os animais foram tratados com a FSM (50 e 100), TIR (1, 2 e 4 mg/kg) , CIPRO 10 mg/kg e água destilada (Controle) e 1 hora depois foram injetados com dextrano a 1,5 %, 0,1ml/pata e em seguida o edema foi medido em pletismógrafo após 1,2,3 e 4 da administração oral das respectivas drogas citadas. Os números representam média ± EPM de 6-8 animais por grupo. * $p < 0.05$ em relação ao controle. ANOVA e Student- Newman-Keuls como *post hoc*.

4 DISCUSSÃO

Cissus verticillata, syn. *C. sycioides*, é uma planta utilizada popularmente no Nordeste do Brasil como antiinflamatório, antiepilético, antihipertensivo, antitérmico, anti-reumático e antidiabético (PUERTA, 2000; MORS; RIZZINE; PEREIRA, 2000; BELTRAME *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2002). Em estudos anteriores (SALES, *et al.*, 2004; 2005; LINO *et al.*, 2005) demonstramos a atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da Fração Solúvel em Metanol obtida a partir do extrato aquoso de *Cissus verticillata* (FSM). No presente estudo foram investigadas as atividades: antidiabética, analgésica, antiinflamatória, antioxidante, dosagens de níveis séricos de uréia, creatinina, alanino transferase (ALT), aspartato transaminase (AST), hemoglobina glicada e conteúdo de glicogênio hepático.

Na avaliação inicial sobre a glicemia em ratos normoglicêmicos tratados por 5 dias com a FSM e TIR observamos uma pequena redução da glicemia somente com a FSM ao contrário da redução bem maior ocorrida com a GLI. Estes resultados preliminares mostram a capacidade da FSM reduzir a glicemia em ratos num tratamento agudo e são comparáveis aos obtidos por BARBOSA *et al.*, (2002), sendo que ele obteve redução da glicemia com o tratamento crônico (30 dias). Segundo este autor o efeito hipoglicemiante do extrato se deve ao canferol livre que é um flavonol com ação diurética e hipoglicemiante.

A FSM também mostrou uma pequena redução na glicemia no teste de tolerância a glicose em ratos normais quando comparada com a GLI. Estudos anteriores mostraram que não foi observado efeito hipoglicêmico com o extrato hidroalcoólico de *C. sycioides* liofilizado para ratos normais após sobrecarga de glicose (SILVA, 1995). Dados publicados posteriormente mostram que o extrato hidroalcoólico de *C. sycioides* aumentou o grau de intolerância a glicose quando associado a dexametasona, conhecida por causar hiperglicemia (BELTRAME *et al.*, 2001). Entretanto, Silva (1995) não descartou a possibilidade de que o excesso de glicose possa ser reduzido pela ingestão do extrato aquoso. Vale salientar que no nosso trabalho a FSM é proveniente de um extrato aquoso de *C. verticillata*.

Por outro lado, a FSM, FRT, TIR e GLI foram ineficazes em reduzir a glicemia em ratos diabéticos com sobrecarga de glicose. Podemos sugerir que esta ausência de efeito em reduzir a glicemia se deva a grande toxicidade do aloxano que causa uma grande redução das células β das ilhotas de Langerhans e induz hiperglicemia associada a sobrecarga de glicose (KASIVISWANATH; RAMESH; KUMAR, 2005). Também podemos salientar que a FSM, mesmo na maior dose (100 mg/kg,v.o), apesar de ter causado um redução

significativa da glicemia no teste de tolerância a glicose em normais, essa redução foi de somente de 19 % (30 min) e 17 % (90 min) que é pequena quando comparada as reduções com a GLI que foram de 42 (60 min), 37 (90 min) e 49 % (120 min). Podemos concluir que essa pequena redução da glicemia com a FSM no teste de tolerância a glicose em normais não foi suficiente para reduzir a glicemia em animais que além de diabéticos, ainda foram submetidos a uma sobrecarga de glicose. Estudos anteriores (PARI; MAHESWARI, 1999; LATHA; PARI, 2004) mostraram que o tratamento com GLI 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$, durante quatro e seis semanas em animais diabéticos após sobrecarga de glicose causa redução significativa da glicemia. Já outro estudo mostra que em ratos diabéticos a GLI mesmo numa dose de 200 mg/kg ,v.o. não causou redução da glicemia num tratamento agudo de 1 a 3 horas (SCHOENFELDER; CIRIMBELLI; CITADINI-ZANETTE, 2006). Pesquisas anteriores mostraram que a glibenclamida é efetiva em ratos com diabetes moderada, mas é ineficaz em ratos com diabetes severa (IVORRA; PAYÁ; VILLAR, 1989; SHARMA; DWIVEDI; SWARUP, 1997). Está bem estabelecido que as sulfoniuréias poduzem hipoglicemia por aumentar a secreção de insulina de pâncreas e esses compostos são ativos no diabetes moderado induzido por aloxano, enquanto são inativos no diabetes severo por aloxano (quase todas as células β tem sido destruídas), (NAMMI *et al.*, 2003).

Desta maneira, podemos concluir que a ineficácia da GLI em reduzir a glicemia em animais diabéticos após sobrecarga da glicose, no nosso estudo, provavelmente se deva não só ao tempo de tratamento e a dose escolhida, mas, principalmente devido a severidade do diabetes. Quanto ao tempo é porque os animais foram tratados somente 30 min antes da sobrecarga de glicose e com relação a dose de 5 mg/kg é baixa quando comparada com o estudo acima citado.

O aloxano é uma substância química derivada do ácido úrico que causa diabetes por destruir as células β das ilhotas de Langerhans. Ele causa degranulação e conseqüentemente degeneração e induz hiperglicemia (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003; ZANATTA *et al.*, 2007). Em nosso estudo preliminar, o aloxano foi utilizado em três doses para avaliar qual a melhor dose e que causava menos mortalidade. A dose de aloxano 40 mg/kg ,i.v. foi a escolhida devido causar uma menor mortalidade (31 %) e não alterou os parâmetros glicêmicos durante o período de 5 dias de tratamento.

Estudos anteriores mostraram o aloxano em diversas doses. Schoenfelder, Cirimbelli e Citadini-Zanette (2006) induziu o diabetes com aloxano 200 mg/kg ,i.p., tendo colhido o sangue 72 horas depois, considerando diabéticos os animais com glicemia maior

que 300 mg/dL. Já Mazzanti *et al.* (2003) utilizou a mesma via, mas baixou a dose para 150 mg/kg, tendo colhido o sangue 15 dias depois e incluído no experimento os animais com glicemia superior a 180 mg/dL. Zannata *et al.* (2006) estudou o aloxano 60 mg/kg,i.v. e mediu a glicemia após 3 dias, incluindo no estudo ratos com glicemia entre 400-550 mg/dL. Já Carvalho, Carvalho e Ferreira (2003) utilizou a nossa mesma dose, ou seja 40 mg/kg,i.v. e mediu a glicemia 10 dias após a indução, considerando diabéticos os animais com glicemia igual ou superior a 200 mg/dL. A mortalidade observada neste estudo foi de 40 % e o autor justifica como causa da mortalidade a acidose. No nosso estudo além da baixa mortalidade (31 %) a dose de aloxano 40 mg/kg causou uma pequena redução de peso (9,5%), demonstrando uma menor toxicidade do aloxano nesta dose..

Os resultados do presente trabalho mostram que em animais diabéticos, tratados por 5 dias, a FSM causou uma redução significativa da glicemia, e dose dependente, e o resultado com a dose maior foi semelhante a GLI. Estes resultados corroboram com trabalhos recentes onde o extrato aquoso das folhas reduziu a ingestão de alimentos e líquidos, o volume de urina excretado, bem como a glicose e uréia urinária quando comparado com o controle em diabéticos induzidos por estreptozotocina e aloxano. Vale ressaltar que neste tipo de preparação farmacêutica o princípio ativo está muito diluído, ou seja, se o princípio ativo for mais concentrado pode resultar num efeito mais potente (PEPATO *et al.*, 2003; VIANA *et al.*, 2004).

Estudos anteriores realizados com plantas antidiabéticas demonstraram que os princípios ativos responsáveis pela atividade anti-diabética são: alcalóides, carboidratos, cumarinas, glicosídeos cianogênicos, flavonóides, glicopeptídios, sais inorgânicos, iridóides, lipídios, peptídios e aminas, fenólicos, fenolpropanóides, esteróides, estilbenos, substâncias sulfúricas, terpenóides, vitaminas e xantonas (NEGRI, 2005; BNOUHAN *et al.*, 2006). Com relação a *C. verticillata*, trabalhos anteriores relatam o isolamento das seguintes substâncias: flavonóides, glicosídeos cumarínicos, esteróides e carboidratos (BELTRAME *et al.*, 2001; 2002; BARBOSA *et al.*, 2002; VIANA *et al.*, 2004). Destas substâncias somente o trabalho de Beltrame *et al.* (2001) estudou os flavonóides (quercetina e canferol) para avaliar uma possível ação insulínogênica. Diferentemente da insulina, os flavonóides testados não estimularam a síntese de glicogênio no músculo sóleo de ratos.

Estudos realizados no laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará demonstraram que a substância predominante na FSM de *C. verticillata* é a tiramina, dado inédito na literatura (ALEXANDRE, 2006). Partindo deste pressuposto de que a substância responsável pela atividade hipoglicemiante poderia ser a tiramina e tendo como

base trabalhos anteriores onde a tiramina demonstrou efeitos semelhantes a insulina, entre eles a inibição da lipólise (VISENTIN *et al.*, 2003) e a melhora a tolerância a glicose em ratos no tratamento agudo (MORIN *et al.*, 2002), estudamos inicialmente a FSM, FRT, Tiramina (TIR) comercial e a droga hipoglicemiante padrão glibenclamida (sulfoniuréia).

No nosso estudo a FRT causou uma redução da glicemia bem maior (64 %) quando comparada com a FSM (45 %). Já a TIR causou uma redução significativa com a menor dose (1 mg/kg), e as doses maiores (2 e 4 mg/kg) não conseguiram aumentar este efeito, mostrando que a TIR, na menor dose já alcançou seu efeito máximo. No nosso estudo tanto a FRT quanto a TIR causaram uma redução significativa da glicemia em animais diabéticos. Estes resultados confirmam ser a tiramina responsável pelos efeitos hipoglicêmicos causados pela FSM. Entretanto quando utilizamos a associação FSM + TIR não houve potencialização dos efeitos, sugerindo que outras substâncias presentes na FSM possam estar bloqueando a ação da TIR.

A glibenclamida (GLI) é uma sulfoniuréia que causa hipoglicemia por estimular a liberação de insulina das células pancreáticas. A administração aguda de sulfoniuréias no diabetes tipo 2 aumenta a liberação de insulina do pâncreas. Dois mecanismos de ação tem sido proposto: redução dos níveis de glucagon no soro e fechamento dos canais de potássio (NOLTE; KARAN, 2007; DAVIS, 2006). No nosso estudo a GLI causou uma redução significativa da glicemia em animais diabéticos, mas quando utilizamos a associação GLI + TIR observamos que não houve potencialização dos efeitos. Sugerindo que o mecanismo de ação da TIR seja diferente da GLI.

Com relação aos triglicerídios e VLDL, observamos que a FSM, FRT e TIR causaram reduções significativas dos seus níveis, semelhante a redução com a GLI. O efeito da FSM, FRT e TIR na hipertrigliceridemia diabética deve ocorrer devido a redução na hiperglicemia. Isto corrobora com o fato de que o controle glicêmico é o principal determinante das concentrações de triglicerídios e VLDL (MARKKU, 1995) e de que a melhora no controle glicêmico seguido da terapia com as sulfoniuréias diminui os níveis de triglicerídio de VLDL (HUUPPONEN *et al.*, 1984,; HUGHES *et al.*, 1985; TASKINEN *et al.*, 1986). Estes dados são semelhantes aos achados por Viana *et al.* (2004) com o extrato aquoso de *C. sycioides* administrado por sete dias em animais diabéticos com ALX e diferentes do estudo de Pepato *et al.* (2003) em que o tratamento com o decocto por um período prolongado não alterou o metabolismo dos lipídios, o qual indica que o mecanismo responsável pela melhora no metabolismo dos carboidratos (diminuição da ingesta de alimentos), em animais tratados com o decocto não envolve a inibição da glicogenólise e/ou

estimulação da gliconeogênese. Vale ressaltar que no estudo acima, em animais normais, o decocto não apresentou mudanças em nenhum dos parâmetros metabólicos testados, significando que o modo de ação do extrato aquoso não se assemelha ao das sulfoniurêias ou insulina.

Com relação ao colesterol total observamos que não houve aumento do mesmo nos animais tratados com aloxano em relação aos normais. Entretanto, houve pequenas reduções do colesterol com, FSM, FRT, TIR e GLI, mas que não devem ser consideradas já que o controle diabético também causou pequenas reduções nos níveis de colesterol após 5 dias de tratamento, corroborando com os estudos anteriores onde o extrato aquoso não causou alteração significativa do colesterol em ratos normais ou diabéticos (VIANA *et al.*, 2004).

Da mesma forma que o colesterol total, o HDL não foi alterado em animais diabéticos induzidos com aloxano, quando comparados com os normais. Entretanto, a FSM e TIR causaram aumento dos níveis de HDL em animais diabéticos, mostrando uma importante ação, já que em diabéticos, geralmente os níveis de HDL estão reduzidos. Sabe-se que uma grande maioria de plantas antidiabéticas atua prevenindo anormalidades no perfil lipídico (GROEVER *et al.*, 2002; LINO *et al.*, 2004). Muitos estudos têm mostrado que um aumento no HDL está associado com a diminuição dos riscos de doenças coronarianas (HARRISON *et al.*, 2003) e a maioria das drogas que diminui o colesterol total também reduz o HDL (WILSON, 1990). No presente estudo a FSM causou uma pequena diminuição no colesterol e também aumentou o HDL.

Com relação aos níveis de uréia e creatinina observamos que eles aumentaram em animais diabéticos induzidos com aloxano quando comparados com o controle normal. Estes resultados são similares a trabalhos anteriores que mostram aumento dos níveis de uréia e creatinina em animais diabéticos (BABU *et al.*, 2003; NARENDHIRAKANNAN *et al.*, 2006). Resultados anteriores mostraram que o decocto das folhas de *Cissus sycioides* administrado por período prolongado a ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina causou redução nos níveis de uréia (PEPATO *et al.*, 2003). Estudos anteriores também confirmaram o uso popular da planta em distúrbios do sistema urinário (LANS, 2006)). No nosso estudo a FSM, TIR (1 mg/kg) e a FRT reduziram os níveis de uréia e creatinina em ratos diabéticos, mostrando que o tratamento com a planta protege o rim contra os danos causados pelo aloxano. Curiosamente, quando associamos FSM + TIR não houve redução dos níveis de uréia. Uma das possibilidades de ausência efeito pode ser devido a pequena redução dos níveis de uréia quando dadas separadamente, não sendo suficiente para causar

potencialização. Já a GLI não reduziu os níveis de uréia e quando associada com a TIR não demonstrou redução. Entretanto quando associamos FSM + TIR e GLI + TIR houve redução nos níveis de creatinina que não foram potencializados. Estes resultados nos levam a conclusão de que *C. verticillata* age por mecanismos diferentes das sulfoniuréias.

Sabemos que as alterações ocorridas ao nível de enzimas hepáticas (alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são indicadores dos danos hepáticos causados pelo aloxano em diabéticos. Resultados anteriores realizados em animais diabéticos, induzidos com aloxano 60 mg/kg,i.v, e tratados por 7 dias com o extrato aquoso de *C.sycioides* mostraram aumento no nível destas enzimas, mas estes valores estão dentro dos limites normais (VIANA *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis de AST e ALT em animais diabéticos induzidos com aloxano, entretanto a FSM, TIR, FRT e GLI causaram pequenas reduções nos níveis de AST e quando associamos FSM + TIR não houve alteração significativa. Entretanto quando avaliamos as respectivas reduções ocorridas nos níveis de AST, observamos que elas estão dentro dos limites normais. Curiosamente, quando associamos GLI + TIR houve uma acentuada redução nos níveis de AST.

Com a finalidade de avaliar os danos hepáticos causados pelo aloxano foi avaliada a atividade antioxidante. O estudo envolveu a avaliação da FSM, FRT, TIR e GLI na peroxidação lipídica (TBARS), nível de glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da catalase. Também foi avaliada a dosagem de nitritos, além da análise histopatológica do fígado.

O aumento da glicemia está diretamente associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio em outros tecidos. Esse excesso de glicose pode causar a glicação de proteínas, processo conhecido como “reação de Maillard” (BAYNES; THORPE, 1999). A glicação de proteínas é o primeiro passo para obtenção da coloração marron de compostos formados quando aquecemos misturas de carboidratos e aminas, comuns no cozimento. Nesse processo, a molécula de glicose pode ligar-se ao radical amino da estrutura de uma proteína, gerando um composto conhecido como “Produto Amadori”. Esse composto pode sofrer uma oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROS) formando os produtos avançados de glicação (AGES) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2003). A glicação de proteínas pode levar à inativação de enzimas do sistema antioxidante do organismo (RELLIER *et al.*, 1999). Uma outra consequência do excesso de moléculas no sangue seria a da molécula de glicose sofrer uma auto-oxidação, através da enolização, gerando um radical enediol. Este radical enediol transfere seu elétron não pareado a uma molécula de O₂,

gerando um ânion superóxido e uma dicarbonila. A dicarbonila liga duas cadeias protéicas formando uma ligação cruzada entre elas e inativando-as (HALLIWEEL; GUTTERIDGE, 2003; WOLF; DEAN, 1987).

A glicação de proteínas causa uma perda da função desta. A enolização da molécula de glicose tem como consequência o aumento na geração de EROS, que podem levar a uma peroxidação lipídica, que consiste da ligação desta ERO a uma ligação insaturada de um ácido graxo, modificando a sua estrutura e, quando submetido ao calor ou hidrólise, leva a formação de malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, o qual reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA)(AYOUB *et al.*, 2000).

Os estudos sobre as alterações na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são controversos. O aumento do TBARS no plasma de ratos diabéticos tratados pode ser atribuído ao aumento na produção dos radicais livres de oxigênio em excesso (KAKKAR *et al.*, 1995; WHAIEB, 1993). Apesar de Limaye, Raghuram e Sivakami (2003) observarem aumento de cerca de 50 % no conteúdo de MDA, Ugochukwu e Cobourne (2003) não mostraram alteração na concentração em ratos diabéticos. No nosso estudo, o aloxano não alterou o TBARS em ratos diabéticos quando comparado com o controle, da mesma forma que a FSM, FRT, TIR e GLI não causaram mudanças significativas. O fato do TBARS não ter aumentado em ratos diabéticos tratados por cinco dias pode ser justificado pelo pequeno período de tratamento com aloxano, já que outros autores só encontraram aumento de TBARS após noventa dias de tratamento com streptozotocina (DIAS *et al.*, 2004).

A dose de aloxano 40 mg/kg,i.v. reduziu significativamente a concentração de GSH no fígado de animais, enquanto o tratamento com a FSM, TIR e GLI reverteu quase a normalidade esse efeito. Entretanto, a FRT aumentou os níveis de GSH, mas esses valores não voltaram aos níveis normais. A GSH, tripeptídeo com um grupo tiol (sulfidril) é um dos agentes antioxidantes mais importante do sistema de defesa da célula envolvida, por exemplo, na detoxificação de agentes químicos e na eliminação de produtos da lipoperoxidação, além de ser requerida na síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas (DENEKE *et al.*, 1989; GALEANO; PUNTARULO, 1995).

As consequências fisiopatológicas da depleção de GSH tem sido extensivamente estudadas. O GSH promove a formação de EROS e o estresse oxidativo com a subsequente cascata de efeitos que afetam a integridade estrutural da célula (RAZA *et al.*, 2000). Trabalhos anteriores mostram que a GSH encontra-se reduzida em fígado de ratos diabéticos e aumentada quando os mesmos foram tratados com *S. dulcis*, conhecida por sua atividade

hipoglicemiante (LATHA; PARI, 2004). O estudo com insulina e drogas hipoglicêmicas possibilita o retorno da atividade das enzimas a valores normais (CHO *et al.*, 2002) e isto foi visto no nosso estudo, confirmando a atividade antioxidante de *C. verticillata*.

A catalase é uma enzima chave do sistema de defesa antioxidante da célula, ela catalisa a redução de H_2O_2 em H_2O e O_2 (HALLIWELL, 2003; NOGUEIRA, 2004). Trabalhos anteriores mostraram aumento da catalase no fígado de animais diabéticos tratados com aloxano (MAZZANTI *et al.*, 2003). Este aumento segundo Kakkar *et al.* (1995) na atividade enzimática é devido ao estresse oxidativo, ocasionado pelo estado diabético e por alta produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, Jorns *et al.* (1999) relataram que o peróxido de hidrogênio não é somente tóxico para as células, mas é também permeável à membrana celular. Estas considerações justificam o aumento da catalase no fígado de ratos diabéticos deste estudo. Por outro lado, o tratamento dos animais diabéticos com a FSM, TIR e GLI reduziu a atividade da catalase, mostrando que essas substâncias possuem atividade removedora de radicais livres, na qual exercem ação benéfica, contra as alterações causadas pela presença de radicais superóxidos e hidroxil. Entretanto a FRT não protegeu os animais do estresse oxidativo causado pelo estado diabético, sugerindo que a dose utilizada pode ter sido tóxica no estudo.

O Aloxano e estreptozotocina são as duas drogas mais comumente usadas no desenvolvimento do diabetes em modelos animais devido sua habilidade em danificar as células beta secretoras de insulina das ilhotas pancreáticas. Foi demonstrado que a estreptozotocina libera óxido nítrico em ilhotas pancreáticas isoladas (TURK, 1993) e o aloxano estimula a formação de superóxido nas células beta (OBERLEY, 1988; COLMAN *et al.*, 1989). Muitas evidências têm sugerido que o óxido nítrico (ON) causa um efeito inibitório sobre a função da mitocôndria nas células beta (GERBITZ, 1992), portanto o ON pode diretamente destruir as células beta. Estudos anteriores mostraram que em ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina houve elevada excreção urinária nitrito/nitrato. A hiperglicemia tem sido geralmente ligada a disfunção glomerular por uma variedade de mecanismos bioquímicos, incluindo uma anormalidade no rim dependente de glicose na produção de ação do ON. O ON é um candidato para mediar a hiperfiltração e aumentada permeabilidade induzida por diabetes. Um estudo analisando a taxa de filtração glomerular e as concentrações de nitrito/nitrato em adolescentes e adultos jovens com diabetes tipo 1 mostrou que a taxa de filtração glomerular e os nitritos/nitratos no soro estavam significativamente mais altos em pacientes diabéticos com microalbuminúria (CHIARELLI *et al.*, 2000).

No nosso estudo os animais diabéticos tiveram os níveis de nitrito/nitrato aumentados e quando os mesmos foram tratados por via oral durante 5 dias com a FSM, TIR e GLI os valores de nitrito/nitrato no plasma foram reduzidos, se aproximando dos valores normais. Contudo, a FRT não protegeu os animais da toxicidade causada pelo aloxano, sugerindo que da mesma forma como aconteceu na catalase, a dose utilizada pode ser tóxica provavelmente por ser alta, já que a TIR apresentou efeito significativo em baixas doses.

Embora o preciso mecanismo de ação do diabetes induzido pelo aloxano ainda permanece incerto, existem evidências de que envolve a degeneração das ilhotas das células β pela acumulação de radicais livres citotóxicos. Após sua administração, o aloxano é concentrado nas ilhotas e no fígado, onde é reduzido a ácido dialúrico. O ácido é instável em solução aquosa e volta a se oxidar em aloxano, acompanhado por formação de O_2 , peróxido de hidrogênio e radicais livres (HALLINWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O diabetes experimental é o resultado de uma inflamação inicial das ilhotas, seguida por uma infiltração de macrófagos ativados e linfócitos no foco inflamatório. Shilajit, uma preparação de erva mineral do Himalaia) conhecida por seus efeitos antidiabéticos e antioxidante, preveniu os danos causados pelos radicais de oxigênio citotóxicos nas ilhotas das células pancreáticas (BHATTACHARYA, 1995; GHOSAL *et al.*, 1995).

No nosso estudo, a avaliação histopatológica mostrou que o pâncreas de ratos diabéticos apresenta células necróticas vacuolizadas e com núcleo picnótico das ilhotas de Langerans, por outro lado nenhuma alteração foi observada no grupo controle normal. Já no pâncreas de ratos tratados com FSM, GLI e TIR observamos regeneração das ilhotas de Langerans, diminuindo a lesão causada pelo ALX 40 mg/kg,i.v, corroborando com os estudos citados por Trivedi *et al.* (2004), onde o tratamento prolongado com Shilajit aumentou o número de células β do pâncreas, isto é uma ação pancreatrófica, a qual pode resultar numa melhor sensibilidade das células β pancreáticas com uma pronta secreção de uma grande quantidade de insulina em resposta a hiperglicemia. Portanto, o número maior de ilhotas encontradas nos nossos animais tratados como a FSM, TIR e GLI causando conseqüentemente maior liberação de insulina, justificam o efeito hipoglicemiante.

No diabetes *mellitus*, os altos níveis de glicose sanguínea desempenham um papel relevante ao aumentar os níveis de proteínas glicadas e produtos finais de glicação avançada (SHIMADA *et al.*, 2005 e SHIMITTA *et al.*, 2005), levando, em última instância,

à disfunção celular que a longo prazo pode acarretar o desenvolvimento de nefropatia, neuropatia, retinopatia e angiopatia (BAYNES; DOMINICZAK, 2000).

A quantificação da glicação da hemoglobina tem importância clínica, pois permite um melhor acompanhamento de pacientes com DM, visto que tal processo reflete o tempo de exposição de proteínas às altas concentrações da glicose plasmática. No caso da hemoglobina, a glicação é o resultado da reação da glicose com o grupamento N-terminal dos resíduos de valina na cadeias β dessa proteína (DE ROSA *et al.*, 1998) A quantificação da hemoglobina glicada torna-se, pois, uma método eficiente e preciso para acompanhamento de pacientes e verificação de alterações teciduais a longo prazo, uma vez que reflete melhor o controle glicêmico das últimas semanas.

Do ponto de vista científico, o desenvolvimento de um método capaz de quantificar a glicação da hemoglobina permite o estudo de diversas substâncias que podem atuar no sentido de atenuar os efeitos deletérios do processo de glicosilação – os inibidores. Nesse ponto, estudos relevantes na literatura apontam para a inibição desse processo por substâncias endógenas e produtos naturais como os flavonóides; o que sugere a existência de um amplo campo de pesquisa, no qual pode-se incluir outros produtos naturais como frações e extratos medicinais. No nosso estudo, a FSM e TIR causaram uma redução significativa da hemoglobina glicada *in vitro* comparável com a quercetina que é um flavonóide. Deste modo podemos concluir que tanto a FSM, como a TIR tem atividade antioxidante.

As complicações crônicas resultantes do diabetes *mellitus* podem resultar da aumentada glicação de proteínas como uma conseqüência da hiperglicemia crônica. Embora o controle dos níveis de glicose sanguínea seja a medida mais importante para retardar o desenvolvimento de complicações crônicas, ele pode ser útil para administrar drogas que inibem a glicação das proteínas. Agentes acetilante e antioxidantes (CHEVION *et al.*, 1977; LAI *et al.*, 1996; SLIGHT *et al.*, 1990) são conhecidos por inibir a glicação da proteína.

Uma importante erva medicinal da Coreia, o ginseng é conhecida por ter propriedade antioxidantes e também por inibir a glicação protéica (CHAM; TOMLINSON, 2000; LIU *et al.*, 2002). De modo semelhante, os nossos resultados mostraram atividade antioxidante da FSM e TIR na dosagem de GSH e catalase em ratos diabéticos e inibição da formação de hemoglobina glicada em ratos não diabéticos. Podemos concluir deste estudo que a FSM deve diminuir diretamente a formação de hemoglobina glicada como resultado de sua atividade antioxidante.

Visto que a FSM mostrou potente atividade hipoglicêmica e antioxidante em animais diabéticos, resolvemos avaliar seus efeitos na dosagem de glicogênio hepático em

animais tratados por via oral durante 10 dias. Em tecidos de animais e humanos, o glicogênio representa o principal carboidrato de estoque.

Estudos anteriores mostraram que em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, os estoques de glicogênio estão diminuídos, entretanto quando os mesmos foram tratados com myricetin (um flavonóide com propriedades hipoglicêmicas) houve restauração parcial dos estoques de glicogênio de aproximadamente 30 %, sem afetar os estoques em ratos normais (ONG; KOO, 2000). Já Beltrame *et al.* (2001) estudou os flavonóides isolados de *C. sycioides* e concluiu que os mesmos, diferentemente da insulina, não estimularam a síntese de glicogênio no músculo sóleo de ratos. No nosso estudo os animais diabéticos induzidos com aloxano apresentaram os estoques de glicogênio reduzidos quando comparados com o controle, entretanto quando os animais foram tratados por via oral com a FSM os níveis de glicogênio hepático voltaram praticamente aos valores normais. Portanto, o efeito hipoglicêmico que aconteceu em animais diabéticos provavelmente é devido ao efeito da FSM sobre o metabolismo do glicogênio.

Com a finalidade de melhor esclarecer o mecanismo de ação da FSM, resolvemos avaliar seus efeitos, utilizando o diazóxido, um antagonista da GLI, conhecido por reverter seus efeitos.

As sulfoniuréias causam hipoglicemia por estimular a liberação de insulina das células β -pancreáticas. Seus efeitos no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 são mais complexos. A administração aguda das sulfoniuréias DM2 causa um aumento na liberação de insulina no pâncreas. As sulfoniuréias se ligam a subunidade SUR 1 e bloqueiam os canais de potássio dependente de ATP. A reduzida condutância ao potássio causa a despolarização da membrana e influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem-sensitivo (DAVIS, 2006).

O diazóxido (DZ) é um antihipertensivo e um derivado antidiurético benzotiadiazina com potente ação hiperglicêmica quando dado por via oral. A hiperglicemia resulta primariamente da inibição da secreção de insulina. O DZ interage com o canal de potássio sensível ao ATP na membrana da célula β e impede o seu fechamento ou prolongamento do seu tempo de abertura: este efeito é oposto ao das sulfoniuréias. O fármaco não inibe a síntese de insulina, de modo que ocorre acúmulo de insulina na célula β . O DZ também possui uma capacidade modesta de inibir a utilização periférica da glicose pelo músculo e estimular a gliconeogênese hepática (DAVIS, 2006).

A secreção de insulina é estimulada por uma seqüência de eventos nos quais a glicose é metabolizada pelas células β pancreáticas para formar um aumento no ATP, seguido por fechamento de canais de potássio sensíveis ao ATP e subsequente despolarização da membrana plasmática da célula β . Isto conduz a uma abertura dos canais de cálcio voltagem-dependente, um aumento na concentração de cálcio citosólico e reações que terminam com exocitose dos grânulos secretórios contendo insulina. (ASCROFT *et al.*, 1992, 1995; ZHAO *et al.*, 2005).

É evidente de muitos estudos que os canais de potássio nas células β pancreáticas podem ser regulados por uma variedade de agentes farmacológicos. Os mais potentes desses agentes são as sulfoniuréias (NELSON *et al.*, 1992). A habilidade das sulfoniuréias (ex., a glibenclamida (GLI)) em baixar a concentração de glicose em pacientes diabéticos parece ser principalmente devido sua habilidade em estimular a secreção de insulina. A habilidade das sulfoniuréias em bloquear os canais de K_{ATP} diretamente explica seu efeito estimulatório sobre a secreção de insulina (SATIN, 1996; DOYLE; EGAN, 2003). Por outro lado, o DZ inibe a liberação de insulina devido sua ação em abrir seletivamente os canais de K_{ATP} das células β pancreáticas, conduzindo a hiperpolarização da membrana plasmática (DUNNE, 1989; SATO *et al.*, 1992; DABROWSKI *et al.*, 2003).

No nosso estudo o DZ causou hiperglicemia em animais normoglicêmicos, sendo seu efeito revertido pela GLI. Já a FSM e TIR não conseguiram reverter a hiperglicemia causada pelo DZ. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação da planta não ocorre por bloqueio dos canais de potássio, ou seja, sua ação ocorre por mecanismo diferente das sulfoniuréias. Partindo deste pressuposto, utilizamos outro hipoglicemiante oral, no caso, metformina com a visando esclarecimento do mecanismo de ação da planta.

A metformina (MET) é uma biguanida com ação antihiperglicêmica e não hipoglicêmica. Ela não causa liberação de insulina do pâncreas e geralmente não causa hipoglicemia, mesmo em doses elevadas. Ela reduz os níveis de glicose pela produção diminuída de glicose hepática e por aumentar a ação da insulina no músculo e tecido adiposo. A nível molecular, estas ações são mediadas pelo menos em parte pela ativação da cinase celular (AMP-cinase). O mecanismo pelo qual a MET diminui a produção de glicose hepática é controversa, mas a maioria dos dados indica um efeito sobre a redução da gliconeogênese. A metformina também pode diminuir a glicose plasmática por reduzir a absorção intestinal de glicose; todavia, não foi constatado que tal ação tenha importância clínica (STUMVOLL *et al.*, 1995; DAVIS, 2006; NOITE; KARAN, 2007).

Estudos anteriores mostraram que o decocto das folhas de *C.sycioides* não afetou o metabolismo dos lipídios, nem o nível de glicogênio hepático em animais. Entretanto, *C. sycioides* reduziu o nível de uréia na urina, isto deve indicar que a planta exerce seus efeitos redutores da glicemia pela inibição da gliconeogênese, como é o caso das biguanidas. Porém o autor enfatiza que são necessários ensaios clínicos farmacológicos sobre o efeito da planta bem como o isolamento e caracterização dos compostos ativos (PEPATO *et al.*, 2003). Já outro estudo (BARBOSA *et al.*, 2002) isolou flavonóides do extrato aquoso das folhas da planta e justifica a atividade hipoglicemiante pela presença de flavonóides com atividade diurética e hipoglicemiante.

No nosso estudo, pela primeira vez foi isolada a TIR presente na planta, logo os nossos estudos prosseguiram com a TIR e observamos que a mesma possui uma significativa capacidade de reduzir a glicemia, colesterol, triglicerídios e VLDL, tanto sozinha, como em associação com a MET. A TIR reduziu a glicemia, e quando associada com MET, este efeito foi aumentado e se aproximou dos valores normais.

Com relação ao colesterol total não houve alteração dos seus níveis em ratos diabéticos, entretanto a TIR e MET administradas por via oral reduziram estes níveis, mostrando o efeito benéfico sobre o metabolismo dos lipídios. Por outro lado, os triglicerídios e o VLDL foram aumentados em animais diabéticos e quando tratados com a TIR e MET por via oral seus níveis foram reduzidos. O colesterol, bem como os triglicerídios e VLDL foram reduzidos com a administração da associação MET + TIR por via oral, entretanto não houve potenciação dos efeitos. Estes resultados confirmam estudos anteriores onde a MET mostrou um favorável impacto sobre o perfil lipídico, diminuindo os triglicerídios, a lipoproteína de baixa densidade (LDL), e os níveis de colesterol total (BAILEY; TURNER, 1996; DEFRONZO, 1999; SETTER *et al.*, 2003).

Os níveis de uréia e creatinina foram aumentados em ratos diabéticos tratados com aloxano. Já administração oral de MET e TIR causou uma redução nos níveis de uréia e creatinina. A associação MET + TIR causou uma leve tendência a potencialização nos níveis de uréia, entretanto não potencializou os níveis de creatinina. Trabalhos anteriores investigando a MET e TIR na atividade hipoglicemiante em animais diabéticos, não dosaram os níveis de uréia e creatinina, portanto não podemos fazer comparações, mas concluir que as duas (MET e TIR), sozinhas ou associadas tem efeito benéfico na função renal.

Com relação a avaliação das enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), as mesmas são úteis na avaliação da função hepática. No

nosso estudo, os animais diabéticos não mostraram alteração significativa nos níveis destas enzimas, contudo a MET e TIR causaram reduções significativas destas enzimas e quando associados houve redução dos seus níveis, mas não ocorreu potencialização. Estes resultados confirmam o efeito benéfico da TIR, protegendo o fígado da toxicidade do aloxano.

A metformina é uma biguanida que tem sido usada em combinação com a sulfoniureia, onde o efeito aditivo é evidente com melhor controle da hiperglicemia (DEFRONZO, 1999; SETTER *et al.*, 2003). Recentemente uma nova substância foi incluída no tratamento do diabetes *mellitus*, é o glucovance, uma associação da MET + GLI. Estudos clínicos mostraram que a associação MET + GLI contida em glucovance proporciona maior eficácia anti-hiperglicêmica em doses menores, porque age na dupla alteração metabólica do diabetes tipo II por meio de um único comprimido (PORTAL diabetes, 2007). No nosso estudo obtivemos efeitos aditivos quando associamos a MET + TIR e não quando associamos GLI + TIR, sugerindo que o mecanismo de ação da TIR é semelhante ao das biguanidas, neste caso a MET. Visto que a TIR é a substância predominante na FSM de *C. verticillata* (ALEXANDRE, 2006) podemos concluir que essa substância seja responsável pela atividade hipoglicemiante da planta.

As doses de FSM (50 mg/kg), GLI (2,5 mg/kg) e FSM (50mg/kg) + TIR(1 mg/kg) foram as que causaram maiores índices de mortalidade e reduziram de modo significativo o peso, isto deve ter sido causado pela hiperglicemia elevada causando efeitos tóxicos nos animais em estudo. Apesar de ter causado uma significativa redução na glicemia, a FRT causou uma redução significativa de peso e uma mortalidade próxima aquela encontrada no controle diabético, e isto se deve provavelmente a quantidade grande de tiramina na mesma. Já quando associamos GLI + TIR observamos uma baixa mortalidade e uma pequena redução de peso dos animais que pode ser consequência do efeito hipoglicemiante da sulfoniuréia quando associada com a TIR.

A MET 50 mostrou ser a melhor dose para o estudo, pois além de causar baixa mortalidade mostrou pequena redução no peso enquanto que a dose de MET 100 causou um alto índice de mortalidade e redução de peso, portanto não foi incluída no estudo. Quando a MET (50 mg/kg) foi associada com a TIR (1 mg/kg) houve uma baixa mortalidade e uma pequena redução de peso semelhante a associação (GLI + MET), confirmando os efeitos benéficos dos hipoglicemiantes. A FSM (100 mg/kg) foi a que causou menor redução de peso e baixa de mortalidade, comparável com a MET (50 mg/kg), significando que é uma dose eficaz no tratamento do diabetes *mellitus*, reduzindo a glicemia e prevenindo da mortalidade por aloxano.

Algumas espécies de *Cissus*, como a *C. quadrangularis* tem atividade analgésica comparável ao ácido salicílico (SING *et al.*, 1984). Outros estudos com *C. quadrangularis* confirmaram que o extrato metanólico da planta causou significativas reduções nas contorções abdominais induzidas por ácido acético e inibiu o tempo de lambertura das patas no teste da formalina, em ambas as fases, em camundongos. Da mesma forma, causou efeito inibitório no edema de orelha causado por etil fenilpropiolalato e o edema de pata induzido por carragenina e ácido aracdônico (PANTHONG *et al.*, 2006).

O teste da formalina é comumente empregado como um modelo de dor aguda e tônica, particularmente como um estímulo nociceptivo químico. Este teste foi descrito originalmente por Dubuisson e Dennis (1977) para ratos e cães. O teste da formalina é considerado um dos modelos mais válidos para o estudo da nocicepção. O teste permite avaliar a resposta do animal a uma dor moderada e contínua causada pelo tecido injuriado bem como o papel dos sistemas endógenos de regulação da dor (TJOLSEN, 1992). A injeção de formalina produz uma resposta bifásica relacionada ao processo doloroso recente e tardio. Este estímulo nociceptivo aumenta a quantidade de substância P no cordão espinhal. O aumento observado nos primeiros 10 minutos se deve principalmente a uma ativação direta da população de nociceptores periféricos, enquanto que a diminuição após este tempo pode ser devido a inativação desta proteína pela formalina. O segundo aumento com 20 a 60 minutos pode ser devido a um subsequente recrutamento das células inflamatórias pelos neurônios aferentes primários adjacentes (MCCARSON; GOLDSTEIN, 1990).

A resposta comportamental a injeção subcutânea de formalina mostra uma fase aguda inicial (fase recente ou 1ª fase) e após um curto período de (10 a 15 min), uma resposta tônica prolongada persistindo por 60 a 90 min (última fase ou 2ª fase). Tradicionalmente, a fase recente ocorre devido a estimulação direta de nociceptores pela formalina, enquanto que a última fase ocorre devido a componentes inflamatórios com a liberação de diferentes substância mediadoras da dor e sensibilização central (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJOLSEN *et al.*, 1992).

No nosso estudo a FSM demonstrou atividade analgésica através da inibição do tempo de lambertura da pata na 2ª fase da dor, considerada dor inflamatória. Entretanto, a TIR causou atividade analgésica na 1ª e 2ª fase da dor somente com as doses maiores (2 e 4 mg/kg), a dose menor (1 mg/kg), só teve efeito na 2ª fase. Portanto, quando associamos a FSM + TIR o efeito analgésico foi potenciado e ocorreu somente na 2ª fase da dor inflamatória, confirmando que o mecanismo de ação analgésica periférica da planta ocorre via inibição da síntese de prostaglandinas. A morfina, um opióide endógeno padrão, como

esperado causou inibição do tempo de lambedura na 1ª e 2ª fase da dor, mostrando efeito analgésico periférico e central, sendo que este último foi bem maior. Já a GLI não inibiu o tempo de lambedura dos animais, mas se mostrou nociceptiva já que o tempo de lambedura foi semelhante ao do controle, confirmando os resultados anteriores em que a mesma não tem efeitos antinociceptivos no teste da formalina e preensão da pata (ALVES; DUARTE, 2002; ORTIZ *et al.*, 2003).

O processo inflamatório é caracterizado pela produção de mediadores inflamatórios, incluindo prostaglandinas, leucotrienos, histamina e bradicinina, além da liberação pelos tecidos e células de fatores quimiotáticos (TOMLINSON *et al.*, 1994). O modelo de inflamação induzido por carragenina (edema de pata e peritonite) é comumente utilizado para avaliar drogas antiinflamatórias. As características bioquímicas e celulares do edema de pata induzido por carragenina foram bem descritas no passado e tem sido constantemente implementadas com novas descobertas (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; DI ROSA; PAPADIMITRIOU; WILLOUGHBY, 1971; DI ROSA, 1982; GARCIA LEME *et al.*, 1973; POUSADAS *et al.*, 2004). O processo envolve uma ação seqüencial de vários mediadores, ocorrendo inicialmente (edema, 0-1 h) a liberação de histamina, serotonina e bradicinina, seguida (edema, 1-6 h), principalmente pelo aumento nos níveis de prostaglandinas (PGs). A liberação de PGs coincide com a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, que amplificam a resposta inflamatória com a produção dentre outros mediadores, de espécies reativas de oxigênio (EROS) e proteases tais como a mieloperoxidase, enzima claramente correlacionada com a severidade do processo (FANTONE; WARD, 1982; NANTEL *et al.*, 1999; POUSADAS *et al.*, 2004). Outro mediador importante é o óxido nítrico (ON), produzido em condições farmacológicas em três isoformas de ON sintase: endotelial, neuronal e induzível (MONCADA; HIGGS, 1991).

Estudo mais recente (GUAY *et al.*, 2004) caracterizou o edema da carragenina numa fase inicial (1-6 h) e tardia (12-24 h). A primeira fase foi associada com o aumento nos níveis de PGE₂ e tromboxano B₂ e com a expressão acentuada de PGE₂ sintase precedida pela expressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2). Porém, COX-2 e PGE₂ sintase permanecem elevadas na fase tardia.

Achados recentes (SING *et al.*, 2006; THORANDI *et al.*, 2003) mostraram evidências de que a inflamação é um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares. Posteriormente, baseado nos achados de que níveis elevados de marcadores inflamatórios, tais como a Proteína C-reativa aumentam o risco de doença

cardiovascular, tem também sido proposta que a inflamação, como medida de tais marcadores, deve ser incluída na definição de síndrome metabólica.

Sabe-se que *C. verticillata*, além do seu uso como hipoglicemiante, tem sido usada como antiinflamatório (GARCIA *et al.*, 2000, BELTRAME *et al.*, 2001). Estudos anteriores mostraram que o extrato metanólico de *C. sicyoides* e seu constituinte resveratrol do hydroxystilbene inibiram a liberação de histamina dos mastócitos na cavidade peritoneal. Desses resultados pode-se deduzir que a atividade antialérgica para a liberação de histamina, na cavidade peritoneal, mostradas pelo extrato metanólico pode ser mediada pelo constituinte resveratrol e pode contribuir para a atividade antiinflamatória da planta (QUILEZ *et al.*, 2004).

No nosso estudo a FSM, TIR (2 e 4 mg/kg) e GLI não apresentaram efeito antiedematogênico no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Entretanto uma redução significativa do edema foi observado com TIR 1 mg/kg somente 24 horas após a indução, mostrando seu efeito na fase tardia. A FSM, somente na dose de 100 mg/kg,v.o, a semelhança da indometacina, inibidor específico da ciclooxigenase, reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Curiosamente quando a dose foi aumentada para 200 mg/kg,v.o a FSM não apresentou efeito inibidor do edema. Os resultados sugerem que o efeito antiinflamatório é muito pequeno e não é dose dependente.

Para investigarmos a possibilidade de envolvimento de outros mediadores inflamatórios na atividade antiinflamatória da FSM e TIR foi avaliado o efeito da administração oral dessas substâncias no edema de pata induzido por dextrano. O dextrano induz o edema por mecanismos distintos em relação a carragenina, neste caso o aumento da permeabilidade vascular dá-se devido a desgranulação de mastócitos, e conseqüente liberação de mediadores inflamatórios como histamina e serotonina. Além disso, o exsudato apresenta poucas proteínas e neutrófilos (LO *et al.*, 1982). No nosso estudo, a FSM, TIR e GLI não apresentaram efeito antiedematogênico no edema de pata induzido por dextrano em ratos e camundongos, confirmando que o seu mecanismo ocorre via inibição de prostaglandinas.

5 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que frações isoladas de folhas de *Cissus verticillata* apresentam várias propriedades farmacológicas que justificam a utilização popular da planta como antidiabética e antiinflamatória. Assim, não somente a fração solúvel em metanol, mas também a fração rica em tiramina e a própria tiramina mostraram propriedades hipoglicemiante e hipolipidêmica, reduzindo de modo significativo não somente a glicemia mas, também, as concentrações de triglicerídios e VLDL, além de uréia e creatinina, em modelo experimental de diabetes em ratos.

A associação de tiramina com glibenclamida, antidiabético oral do grupo das sulfoniluréias, cujas principais ações consistem no aumento de liberação de insulina do pâncreas e fechamento de canais de K⁺, não resultou em potencialização dos efeitos hipoglicêmicos nem hipolipidêmicos. Este fato sugere que, possivelmente, a droga não age através do bloqueio de canais de K⁺ em tecidos extra-pancreáticos, como o faz a glibenclamida. Adicionalmente, a associação entre a FSM ou TIR com diazóxido, droga que inibe a liberação de insulina, não bloqueou o efeito hiperglicêmico do diazóxido, efeito que foi antagonizado pela glibenclamida.

Contudo, a associação de tiramina com metformina, uma outra droga hipoglicemiante oral do grupo das bigaunidas e que atua através da abertura de canais de K⁺ sensíveis ao ATP resultou em potencialização dos efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos da tiramina. Estes resultados indicam que, possivelmente, o mecanismo de ação dos princípios bioativos da planta é semelhante àquele apresentado pela metformina.

A FSM foi eficaz em aumentar o número de células beta do pâncreas, indicando efeito protetor contra a citotoxicidade induzida pela aloxano.

Tanto a FSM, quanto a tiramina apresentaram potente ação antioxidante, reduzindo o percentual de hemoglobina glicada, atuando favoravelmente nas enzimas antioxidantes e reduzindo a formação de radicais livres.

Apesar da FSM apresentar pequena atividade antiinflamatória, seus efeitos analgésicos foram potencializados pela tiramina.

Portanto, os resultados do estudo enfatizam o potencial antidiabético e antioxidante de *C. verticillata* e indicam que pelo menos parte dos efeitos farmacológicos observados são devidos à presença de tiramina na planta. Contudo, a participação de outros constituintes nos efeitos observados não pode ser descartada.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-ZAHER, A. O.; SALIM, S. Y.; ASSAF, M. H.; ABDEL-HADY, R. H. Antidiabetic activity of *Zizphus spina-chirsti* leaves. **J. Ethnopharmacol.**, v. 101, p.129-138, 2005.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods of Enzymatic Analyses**, v.2, p. 673-678, 1984.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. for the WHO Consultation. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Méd.**, v.15, p. 539-553, 1998.
- ALBUQUERQUE, J. M. D. **Plantas medicinais de uso popular**. [S.l.]: ABEAS, 1989.
- ALEXANDRE, F. S. O. **Análise fitoquímica de plantas do Ceará: potencial farmacológico de *Cissus verticillata* e composição volátil de *Myrcia sp.*** 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, 2006.
- ALMEIDA, R. N.; MEDEIRO FILHO, J.; NAIK, S. R. Chemistry and pharmacology of an ethanol extract of *Brumelia sartorum*. **J. Ethnopharmacol.**, v.14, p. 173-185, 1985.
- ALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M.; HOMAYOUNFAR, H.; HOSSEINI, M. Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 139-144, 2003.
- ALVES, D.; DUARTE, I. involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 24, p.47-52, 2002.
- ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Ásia. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p.223-230, 2003.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, supl. 1, Jan. 2005.
- AMOS, A. F.; MCCARTY, D.J.; ZIMMET, P. The rising global burden of diabetes and its complications; estimates and projections to the year 2010. **Diabetic Med.**, v.14, n.5. p.81-85, 1997.
- ANDERSON, J.R.J.H.; BRUNELLE, R. L.; KOIVISTO V.A.; PFÜTZNER, A.; TRAUTMANN, M. E.; VIGNATI, L.; DIMARCHI, R. Reduction of postprandial hyperglycemia and frequency of hypoglycemia in IDDM patients on insulin-analog treatment. **Diabetes**, v. 46, n. 2, p.265-270, Feb. 1997.
- ANJALI, P.; MANOJ, K. M. Some comments on diabetes and herbal therapy. **Ancient Sci. Life**, v. 15, p. 27-29, 1995.

ANURADHA, K.; HOTA, D.; PANDHI, P. Possible mechanisms of insulin antinociception. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 26, p. 5-8, 2004.

ARAUJO, L. M. B. Novas opções no tratamento do *diabetes mellitus* não insulino-dependente. **Diabetes & Metabolismo**, v. 1, p. 4-9, 1997.

ARAÚJO, L.C.L.; MARIN, E. C.; MORIGUSHI, P. Estudos preliminares das atividades farmacológicas e toxicológicas do extrato hidroalcoólico de *Cissus succiaulis* Baker. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14., 1996, Florianópolis. **Resumos...** Florianópolis: [s.n.], 1996.

ARICHI, H.; KIMURA, Y.; OKUDA, H.; BABA, K.; KAZAMA, M. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. Et Zucc. On lipid metabolism. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 5, p. 1766-1770, 1982.

ARDUÍNO, E.; SOARES, M.L.N.G. Ação hipoglicemiante do *Anacardium occidentale* L. (cajeiro) em indivíduos normais. **Brasil Médico** [S.I], n.31-32, p.15-18, 1951.

ASGARY, S.; NADERI, G.H.; SARRAFZADEGAN, N.; GHASSEMI, N.; BOSHTAM, M.; RAFIE, M.; REFIAN, A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. **Pharmac. Act. Helvet.**, v.73, p. 223-226, 1999.

ASHCROFT, F.M.; WILLIAMS, B.; SMITH, P.A.; FEWTRELL, C.M.S. Ion channels involved in the regulation of nutrient-stimulated insulin secretion. In: FLATT, P. R. (Ed.). **Nutrient regulation of insulin secretion**. London: Portland Press, 1992. p.193-212.

ATAWODI S. E.; ARNEH, D. A.; IBRAHIM, S.; ANDREW, J. N.; NZELIBE, H. C.; ONYIKE, E. O.; AMIGO, K. M.; ABU, E. A.; SALLAU, A. B. Indigenous Knowledge system for treatment of trypanosomiasis in Kaduna state of Nigéria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 79, p. 279-282, 2002.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet.**, v.358., p.221- 229, 2001.

AYOUB, R. S.; YOUSIF, W. H.; AZIZ, B. N. Serum glucose, cholesterol and total lipids and tissue lipid peroxidation in alloxan-diabetic rats treated with aqueous extract of *Nigella sativa* seeds. **Iraqi J. Vet. Sci.**, v.16, p.43-49, 2000.

BABU, V.; GANGADEVI, T.; SUBRAMONIAM. Antidiabetic activity of ethanol extract of *Cassia kleinii* Leaf in streptozotocin-induced diabetic rats and isolate of an active fraction and toxicity evaluation of extract. **Indian J. Pharmacol.**, v. 35, p. 290-296, 2003.

BAE, J. W.; LEE, M. E. Effect and putative mechanism of action of ginseng on the formation of glycated hemoglobin in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 137-140, 2004.

- BAEKESKOV, S.; AANSTOOF, H.; CHRISTGAU S.; REETZ, A.; SOLIMENA, M.; CASCALHO, M. *et al.* Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, v. 347, p. 151, 1990.
- BAILEY, C. J.; DAY C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, p. 553-564, 1989.
- BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Metformin. **N. Engl. J. Med.**, v.334, p.574-579, 1996.
- BALUCHENEJADMOJARAD, T; ROGHANI, M; HOMAYOUNFAR, H; HOSSEINI, M. Beneficial effect of aqueous garlic extract on the vascular reactivity of streptozotocin diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.85, p.139-144, 2003.
- BARBOSA, W. L. R.; dos SANTOS, W. R. A.; PINTO, L. N.; TAVARES, I. C. C. Flavonóides de *Cissus verticillata* e a atividade hipoglicemiante do chá de suas folhas. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.12, p.13-15, 2002.
- BAYNES, J.; DOMINICZAK, H. M. **Bioquímica médica**. São Paulo: Manole, 2000.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405-411, Apr. 1991.
- BAYNES, J. W.; TORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on old paradigm. **Diabetes**, v. 48, n. 1, p.1-9, Jan. 1999.
- BELL JR, R. H.; HYE, R. J. Animal models of *diabetes mellitus*: physiology and pathology. **J. Surg. Res.**, v. 35, n. 5, p. 433-460, Nov. 1983.
- BELTRAME, F. L.; FERREIRA, A. G., CORTEZ D.A. Coumarin glycoside from *Cissus sicyoides*. **Nat. Prod. Lett.**, v. 6, p.213-216, 2002.
- BELTRAME, F. L.; SARTORETTO, J. L.; BAZOTTE, R. B.; CUMAN, R. N.; CORTEZ, D. A. G. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L (Vitaceae). **Qui. Nova**, v.24, p.783-785, 2001.
- BHATTACHARYA, S.K Shilajit attenuates streptozotocin induced DM & decrease in pancreatic islet superoxid dismutase activity in rats. **Phytoter. Res.**, v.9, p.41-44, 1995.
- BHATTACHARYA, S. K.; SEN, A. P. Effect of Shilajit on biogenic free radicals, **Phytoter. Res.**, v. 9, p. 56-59, 1995.
- BIAGGONI, I. Vasodilation during systemic administration response. **Circulation**. v. 109 , p. 17-18, 2004.
- BLISS, M. **The Discovery of Insulin**. Chicago: University of Chicago Press, 2000.
- BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A.; HASSANE, M.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity- A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **Int. J. Diabets Metabolism**, v.14, p.1-25, 2006.

- BOLOKER, J.; GERTZ, S. J.; SIMMONS, R. A. Gestational diabetes leads to the development of diabetes in adulthood in the rat. **Diabetes**, v; 51, p.1499–1506, 2002.
- BONO, V. H. Review of mechanism of action studies of the nitrosureas. **Cancer Treat. Rep.**, v. 60. p.699–702, 1976.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 1985.
- BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas medicinais antidiabéticas**. Niterói: UFF, 1996
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Cadernos de atenção básica: Hipertensão Arterial sistêmica e Diabetes Mellitus - Protocolo**. Brasília, DF, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. DATASUS. Brasília, DF, 1988. Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2008.
- BRUNING, J. C.; MICHAEL, M. D.; WINNAY, J. N.; HAYASHI, T.; HORSCH, D.; ACCILI, D.; GOODYEAR, L. J.; KAHAN, C. R. A Muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. **Mod. Cell.**, v. 2, n. 5, p. 559-569, 1998.
- BRUNO, R. M.; GROSS, J. L. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6 year follow-up study. **J. Diabetes Complications**, v.14, n. 5, p. 266-271, Sept./Oct. 2000.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Micosomol lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 52, p. 302-310, 1978.
- BUSHWALD, H.; AVIDOR, Y.; BRAUNWAD, E.; JENSEN, M.D.; PORIES, W.; FAHRBACH, K. *et al.* Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v.292, p. 1724-1737, 2004.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Bras. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 179-189, 2000.
- CAMBON, C. Hydrogen peroxide generation by monoamine oxidases in rat white adipocytes: role on cAMP production. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 395, p. 177-182, 2000.
- CARACTERÍSTICAS Y aplicaciones de las plantas. Disponível em: <<http://www.zona-verde.net plantas@zonaverde.net>>. Acesso em: 12 set. 2006.
- CARVAJAL, D.; CASACO, A.; ARRUZAZABALA, L.; GONZALEZ, R.; SIERRA, P.; COLEMAN, R.; RAHMAN, K. Lipid flow in bile formation. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 1125, n. 2, p. 113-133, 1992.

CARVALHO, A. C. B.; DINIZ, M. F. F. M.; MUKHERJEE, R. Estudos da atividade antidiabética de algumas plantas de uso popular contra o diabetes no Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v. 86, p.11-16, 2005.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir. Bras.**, v. 8, p. 60-64, 2003.

CHAGNON, Y. C.; BOUCHARD, C. Genetics of obesity: advances from rodent studies. **Trends Genet.**, v. 12, p. 441-444, 1996.

CHAN, P.; TOMLINSON, B. Antioxidant effects of Chinese traditional medicine: focus on trilinolein isolated from the Chinese herb sanchi (*Panax pseudoginseng*). **J. Clin. Pharmacol.**, v. 40, n. 5, p. 457-461, May 2000 .

CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.**, p.764-768, 1955.

CHAPMAN, T. M.; PERRY, C. M. Insulin Detemir. A review of its use in the management of type 1 and 2 Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 64, n. 22, p.2577-2595, 2004.

CHENG, J.; HUANG, C.; LIU, I.; TZENG, T.; CHANG, COISSON, J.D.; CERUTTI, C.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M. Production of biogenic amines in "Salami italiani alla cacciatora PDO. **Meat Science**, v. 67, n. 2, p.343-349, 2004.

CHEVION, S.; HOFMAN, M.; ZIEGLER, R.; CHEVION, M.; NAWROTH, P.P. The antioxidant properties of thiocitic acid; characterization by cyclic voltammetry. **Biochem. Mol. Biol.**, v. 41, p.317-327.

CHIARELLI, F.; CIPOLLONE, F.; ROMANO, F.; TUMINI, S.; COSTANTINI, F.; DI RICCO, L. *et al.* Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microralbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration. **Diabetes**, v. 49, n. 7, p.1258-1263, July 2000.

CHIASSON, J. L.; JOSSE, R. G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. **Lancet**, v.359, n. 9323, p. 2072-2077, June 2002.

COLLIER, A.; WILSON, R.; BRADLEY, H.; THOMSON, J. A.; SMALL, M. Free radical activity is type 2 diabetes. **Diabetic Med.**, v. 7, p.27-30, 1990.

COLMAN, P. G.; WANG, L. I.; LAFFERTY, K. J. Molecular biology and autoimmunity of type I diabetes mellitus. *In*: DRAZINI B.; MELMED, S.; LEPOITH, D. (Ed.). **Molecular and cellular biology of Diabetes Mellitus**. [S.l.: s.n.], 1989. p. 125-137.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977.

CUMMINGS, D.E.; OVERDUIN, J.; FOSTER-SCHUBERT, K.E. Gastric bypass for obesity: mechanisms of weight loss and diabetes resolution. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 2608-2615, 2004.

CUNHA, F. M.; FRÖDE, T.S.; MENDES, G. L.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sequiterpeno polygodial. **Life Sciences**, v.70, p.159-169, 2001.

CUSI, K.; DEFRONZO, R.A. Metformin: a review of its metabolic effects. **Diabetic Rev.**, v. 6, p. 89-130, 1998.

CUSSIMANO, B.L.; BOOTH, A.A.; TODD, P.; HUDSON, G. B.; KHALIFAH, R.G. Unusual susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non- enzymatic glycation. **Biophys. Chem.**, v. 105, p. 743-755, 2003.

DABROWWSKI, M.; LARSEN, T.; ASHCROFT, J.; BONDO HANSEN, J.; WAHL, P. Potent and selective activation of the pancreatic beta-cell type of K_{ATP} channel by two novel diazoxide analogues. **Diabetologia**, v.5, p.71-75, 2003.

DANDREA, G.; TERRAZINO, S.; LEON, A.; FORTIN, D.; PERINE, F.; GRANELLA, F.; BUSSONE, G. Elevated levels of circulating trace amines in primary headaches. **Neurology**, v. 62, p. 1701-1705, 2004.

DANSA, A. M. L.; VILLARRUZZ, M.V.C.; JIMENO, C. A.; JAVELOSAB, M. A.U.; CHUAA, J.; BAUTISTAA, R.; VELEZA, G. G. B. The effect of *Momordica charantia* cápsula preparation on glycemic control in Type 2 Diabetes Mellitus needs further studies **J. Clin. Epidemiol.**, v. 60, n. 6, p. 554-559, 2007.

DAVIS, S. N. Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. *In*: _____. **Goodman and Gilman: The pharmacological basis of therapeutics**. 11th ed. [S.l.]: Mc Graw Hill, 2006. cap. 60.

DE ROSA, M.C.; SANNA, M.T.; MESSANA, I.; CASTAGNOLA, M.; GALTIERI, A.; TELLONE, E.; SCATENA, R. *et al.* Glycated Human Hemoglobin (HBA1c): Functional characteristics and molecular modeling studies. **Biophys. Chem.**, v. 72, p. 323-335, 1998.

DEFRONZO, R. A. Pharmacologic therapy for type-2 diabetes mellitus. **Ann. Intern. Med.**, v.131, p.281-303, 1999.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v.257, p.L163-173, 1989

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.24, p.89-102, 1982.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.**, v.104, p.15-229, 1971.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D.A. A histopathological and pharmacological analyses of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J. Pathol.**, v.105, p.239-256, 1971.

DI STASI, L.C.; HIRUMA, C.A.; GUIMARÃES, E. M. *et al.* **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Ed. UNESP, 1989.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.**, v.329, n. 14, p. 977-986, Sept. 1993.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The effects of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: the Diabetes Control and Complications Trial. **J. Pediatr.**, v.125, n. 2, p. 177-188, Aug. 1994.

DIAS, A.S.; LLESUY, S.; MARRONI, C. A.; MARRONI, N. Alterações gastrointestinais no Diabetes mellitus: estresse oxidativo e fluxo sanguíneo da artéria mesentérica-estudo experimental. **Arq. Gastroenterol.**, v.41, p.108-113, 2004.

DOYLE, M. E.; EGAN, J. M. Pharmacological agents that directly modulate insulin secretion. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, p.105-131, 2003.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977.

DUNN, C.J.; PLOSKER, G. L.; KEATING, G. M.; MCKEAGE, K.; SCOTT, L. J. Insulin Glargine. An updated review of its use in the management of Diabetes Mellitus. **Drugs**, v. 63, n. 16, p.1743-1778, 2003.

DUNN, J. S.; MCLETCHE, N. G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet**, v. 2, p. 384, 1943.

DUNNE, M. J. Protein phosphorylation is required for diazoxide to open ATP-sensitive K⁺ channels in insulin (RINm5F) secreting cells. **FEBS letters**, v. 250, p.262-266, 1989.

EKA, D. K.; LAHON, L. C.; SAIKIA, J.; MUKIT, A. Effect of *Cissus quadrangularis* in accelerating healing process of experimentally fractured radius-ulna of dog: A preliminary study. **Indian J. Pharmacol.**, v. 26, p. 44-45, 1994.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; EL-NAGA, N. I. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic in alloxan-induce diabetic rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 57-63, 2005.

ELISABETSKY, E.; SANTANA, H. Avaliação psicofarmacológica de um anticonvulsivante caseiro. **Ciênc. Cult.**, v. 36, n. 7, p. 990-991, 1984.

ELISABETSKY, E.; TEIXEIRA, K. M. C.; CARRERA, M. P.; MOURA, B. A. S.; MULLER, A. H. Ação anticonvulsivante de *Cissus sycioides*, cipó-pucá. **Ciênc. Cultura**, v. 40, p.985, 1988.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 82, p.70-77, 1959.

ESPÓSITO, K.; GIUGLIANO, D.; NAPPO, F.; MARFELLA, R. Regression of carotid herosclerosis by control of postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Circulation**, v. 110, p. 214-219, 2004.

EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, THE. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v.20, p.1183, 1997.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Role of oxygen-derived free radicals in metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. **Am. J. Pathol.**, v.107, n. 3, p. 395-4198, 1982.

FARJARDO, M.; TIMOR C.; ROBAINA C.; FUENTES V. Pharmacological screening of plant detections commonly used in cuban folk medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 33, p. 21-24, 1983.

FARMER, J.A.; GOTTO JR., A. M. Choosing the right lipid-regulating agent. A guide to selectoin. **Drugs**, v. 52, p. 649-661, 1996.

FARNSWORTH, N. R. Medicinal plants in therapy. **Bull. Word Helth Org.**, v. 63 , p. 965-981, 1985.

FARNSWORTH, N. R.; SEGELMAN, A.B. Hypoglycemic plants. **Tipe Till**, v. 57, p. 41-56, 1971.

FINEGOOD, D.T.; MCARTHUR, M. D.; KOJWANG, D.; THOMAS, M. J.; TOPP, B.G.; LEONARD, T. *et al.* β -cell mass dynamics in Zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. **Diabetes**, v. 50, n. 5, p. 1021–1029, May 2001.

FLYVBJERG, A.; LANDAU, D.; DOMENE, H.; HERNANDEZ, L.; GROENBAEK, H.; LEROITH, D. The role of growth hormone, insulin-like growth factors (IGFs), and IGF-binding proteins in experimental diabetic kidney disease. **Metabolism**, v. 44, p. 67–71, 1995.

FUNNELL, M. M.; ANDERSON, R. M. **Role of diabetes education in patient management: therapy for diabetes mellitus and related disorders** 4 ed. [S.l.]: American Diabetes Association, 2004.

GABBAY, M.A.L.; DIB, S. A. Insulinoterapia no Diabetes Tipo 1. *In*: LYRA, R E.; CAVALCANTI, M. **Diabetes Mellitus**. 1. ed. [S.l.]: Diagraphic Editora, 2006. cap. 26, p. 265.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants of erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1271, p.321-326, 1995.

GARCIA LEME, J.; HAMAMURA, L.; LEITE, M. P.; ROCHA e SILVA, M. Pharmacological analyses of the acute inflammatory process induced in the rats's paw by local injection carrageenin and by heating. **Br. J. Pharmacol.**, v. 48, n. 1, p. 48-96, May 1973.

GARCIA, M. D.; QUILEZ, A. M.; SAENZ, M.T.; MARTINEZ-DOMINGUEZ, M. E.; DE LA PUERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 71, p.395-400, 2000.

GARCIA, X.; CARTES-HEREDIA, L.; LORENZANA-JIMENEZ, M.; GIJON, E. Vasoconstrictor effect of *Cissus sicyoides* on guinea-pig aortic rings. **Gen. Pharmacol.**, v. 29, p.457-462, 1997.

GARCIA-MARTIN, J. J.; VILLANUEVA, G. R.; ESTELLER, A. Diabetes-induced cholestasis in the rat: possible role of hyperglycemia and hypoinsulinemia. **Hepatology**, v.8, p.332-340, 1988.

GELONEZE, B.; REPETTO, E. M.; PILLA, V. F.; TAMBASCIA, M. A.; PAREJA, J. C. Ghrelin: a gut-brain hormone. Effect of gastric by-pass. **Obes. Surg.**, v. 13, p. 17-22, 2003.

GERBITZ, K.D. Does the mitochondrial DNA play a role in the pathogenesis of diabetes? **Diabetologia**, v. 35, p.1181-1186, 1992.

GHOSAL, S.; SOUMYA, L.; KUMAR Y. Interaction of Shilajit with biogenic free radicals. **Indian J. Chem.**, v. 34, p. 596-602, 1995.

GOLDSTEIN, D. S.; HOLMES, C.; JACOB, G.; COSTA, F.; VISENTIN, S.; ROBERTSON, D. *et al.* Tyramine stimulates glucose uptake in insulin-sensitive tissues in vitro and in vivo its oxidation by amine oxidases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303 , p. 1238-1247, 2002.

GOTO, Y.; KAKIZAKI, M.; MASAKI, N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.119, p.85-90, 1976.

GRAY, A.; FLATT, P. R. Insulin-secreting activity of the traditional antidiabetic plant *Viscum album* (mistletoe). **J. Endocrinol.**, v.160, p. 409-414, 2005.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GROVER, J. K., VATS, V. Shifting paradigm "from conventional to alternative medicine". An introduction on traditional Indian Medicine. **Asia Pacific Biotech. News**, v.5, n.1, p.28-32, 2001.

GROVER, J. K.; YADAV S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **J. Etnofarmacol.**, v.81, n.1, p. 81-100, 2002.

GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MANCINI, J.; RINDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rats elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **J. Biol. Chem.**, v.279, p. 24866-24872, 2004.

HALL, J. A.; GRADIN, J. L.; ANDREASEN, C. B.; WANDER, R. C. Use of a nonionic detergent (Triton WR 1339) in healthy cats to assess hepatic secretion of triglycerides. **Am. J. Vet. Res.**, v. 61, p. 941 – 950, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Science Publications Oxford, 2003.

HANDA, S. S.; CHAHLA, A. S., MANINDER. Hypoglycemic plants: a review. **Fitoterapia**, v. 60, p. 195-224, 1989.

HANNA, F.W.F.; PETERS, J. R. Screening for gestational diabetes: past, present and future. **Diabetic Med.**, v. 19, p. 351, 2002.

HANSEN, B. F.; DANIELSEN, G. M.; DREJER, K.; SORENSEN, A. R.; WILBERG, F.C.; KLEIN, H. H. *et al.* Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. **Biochem. J.**, v. 315, p. 271–279, 1996.

HARRISON, D.; KATHY, V.; HORING, B.; DREXLER, H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. **Am. J. Cardiol.**, v. 91, p.7A-11A, 2003.

HERNANDEZ, V.; RECIO, M.C.; MÁNEZ, S.; PRIETRO, J. M.; GINER, R.M.; RIOS, J. L. A mechanistic approach to the in vivo anti-inflammatory activity of the sesquiterpenoid compounds isolated from *Inula viscosa*. **Planta Medica**, v.67, p. 726-731, 2001.

HEROLD, K. G.; LENSCHOW, D. J.; BLUESTONE, J. A. CD28/B7 regulation of autoimmune diabetes. **Immunol. Res.**, v.16, n. 1, p.71–84, Feb. 1997.

HOLEMANS, K.; AERTS, L.; VAN ASSCHE, F.A. Lifetime consequences of abnormal fetal pancreatic development. **J. Physiol.**, v. 547, p.11–20, 2003.

HOLLANDER, P.A.; BLONDE, L.; ROWE, R.; MEHTA, A. E.; MILBURN, J. L.; HERSHON, K. S. *et al.* Efficacy and Safety of inhaled insulin (Exubera) compared with subcutaneous insulin therapy in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 10, p. 2356-2362, Oct. 2004.

HOLSTAD, M.; SANDLER, S. A transcriptional inhibitor of TNF- α prevents diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin injections in mice. **J. Autoimmun.**, v. 16, p.441–447, 2001.

HUGHES, T. A.; KRAMER, J. O.; SEGREST, J. P. Effects of gliburide therapy on lipoproteins in noninsulin dependent diabetes mellitus. **Am. J. Med.**, v.9, p. 86-91, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-114, 1987.

HUO, -Y.; WINTERS, W. D.; YAO, -D.L. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytother. Res.**, v.17, n. 1, p. 48-55, Jan. 2003.

HUONG, N. T. O.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAAKI, K.; WAATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its constituents. **Bio. Pharm. Bull.**, v. 21 , p. 978-981, 1998.

HUPPONEM, R. K.; VIKARI, J. S.; SAARIMA, H. Correlations of serum lipids with diabetes control in sulfonylurea-treated diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 7, p. 575-578, 1984

IKEDA, H. K. K mouse. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 24, p. 313, 1994.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 27, p. 243-275, 1989.

JACOB, G.; COSTA, F.; VINCENT, S.; ROBERTSON, D.; BIAGGONI, I. Neurovascular dissociation with paradoxical forearm vasodilation during systemic tyramine administration. **Circulation**, v. 107, p. 2475-2479, 2003.

JAFRI, M. A.; ASLAM, M.; JAVED, K.; SINGH, S. Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on the blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 70, n. 3, p. 309-314, June 2000.

JAHR, H.; HUSSMANN, B.; ECKHARDT, T.; BRETZEL, R.G. Successful single donor islet allotransplantation in the streptozotocin diabetes rat model. **Cell Transplantation**, v.11, p. 513-518, 2002.

JAIN, S. K. Glutathione and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation. **Planta Medica**, v.24, p.197-201, 1998

JAIN, S. R.; SHARMA, S. N. Hypoglycemic drugs of Indian indigenous origin. **Planta Medica**, v. 15, p. 439-442, 1967.

JAINU M.; DEVI, C.S.S. Effect of *Cissus quadrangularis* on Gastric Mucosal Defensive Factors in Experimentally Induced Gastric Ulcer. A Comparative Study with Sucralfate. **J. Med. Food**, v.7, p. 372-376, 2004.

JANSEN, S.C.; VAN DUSSELDORP, M.; BOTTEMAS, K. C.; DUBOIS, A. E. Intolerance to dietary biogenic amines: a review. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 91 , p. 233-240, 2003.

JORNS, A.; TIEDGE, M.; LENZEN, S.; MUNDAY, R. Effect of superoxide dismutase, catalase, chelating agents, and free radical scavengers on the toxicity of alloxan to isolated pancreatic islets in vitro. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, n. 9/10, p.1300-1304, May 1999.

- JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; STAUFFACHER, W.; RENOLD, A.E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **J. Clin. Invest.**, v. 48, p. 2129–2139, 1969.
- KAKKAR, R. KALRA, J.; MANTHA, S.V.; PRASAD, K. Lipid peroxidation activity of antioxidant enzymes in diabetic rats. **Mol. Cell. Biochem.**, v.151, n. 2, p.113-119, Oct. 1995.
- KASIVISWANATH, R.; RAMESH, A.; KUMAR, K. K. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Gmelina asiatica* Linn. In Normal and alloxan induced diabetic rats. **Bio. Pharm. Bull.**, v. 28, n.4 p.729-732, 2005
- KHANNA, P.; JARN, S. C.; PANAGARIYA, A. *et al.* Hypoglycaemic activity of polypeptide-P from a plant source. **J. Nat. Prod.**, v. 44, p. 648-655, 1981.
- KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W.H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**, v. 21, n. 9, p. 1414-1431, 1998.
- KOSHIYAMA, H.; SHIMONO, D.; KUWAMURA, N.; MINAMIKAWA, J.; NAKAMURA, Y. Inhibitory effect of pioglitazone on carotid arterial wall thickness in type 2 diabetes. **J. Clin. Endocrinol Metabol.**, v. 86, p. 3452-3456, 2001
- KUMARI, K.; AUGUSTI, K.T. Antidiabetic effects of S-methylcysteine sulfoxide on alloxan diabetics. **Planta Medica**, v.61, n.1, p.72-74, 1995.
- LAL, S.; CHITRA, P.; CHANDRAKASAN, G. The possible relevance of autoxidative glycosylation in glucose mediated alterations of proteins: an in vitro study on myofibrillar proteins. **Mol. Cell. Biochem.**, v.154, n. 2, p. 95-100, Sept. 1996 .
- LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.2, p.1-2, 2006.
- LANZA, R. P.; ECKER, D. M.; KUHTRIEBER, W. M.; MARSH, J. P.; RINGELING, J.; CHICK, W. L. Transplantation of islets using microencapsulation: studies of diabetic rodents and dogs. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 206–210, 1999.
- LATHA, M.; PARI, L. Effects of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p.577-585, 2004.
- LEAHY, J. L.; BUMBALO, L. M.; CHEN, C. Diazoxide causes recovery of beta-cell glucose responsiveness in 90 % pancreatectomized diabetic rats. **Diabetes**, v. 43, n. 2, p. 173-179, 1994.
- LEBOVITZ, H. E. (Ed.). **Therapy for diabetes mellitus and related disorders**. 4th ed. Alexandria, VA: American Diabetes Association, 2004.

LEE, G. H.; PROENCA, R.; MONTEZ, J. M.; CARROLL, K. M.; DARVISHZADEH, J. G.; LEE, J. I. *et al.* Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v.379, p.632–635, 1996.

LEIBEL, R. L.; CHUNG, W. K.; CHUA, S. C. The molecular genetics of rodent single gene obesities. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 31937–31940, 1997.

LENZEN, S.; PATTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v.31, p.337–342, 1988.

LI, W.; ZHENG, H.C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.**, v.92, p.1-21, 2004.

LIMAYE, P.V.; RAGHURAN, N.; SIVAKAMI, S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Mol. Cell Biochem**, v.243, p.147-152, 2003.

LINO, C. S.; DIÓGENES, J. P. L.; BASTOS, M. V. R.; ANDRADE NETO, M.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; SILVA, M. G. V.; VIANA, G. S. B. Estudo da Atividade Hipoglicemiante e Hipolipemiante de *Bauhinia forficata*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 12., 2002, Salvador. **Livro de Resumo...**Salvador: [s.n.], 2002. n.20092.

LINO, C. S.; SALES, T. P.; ALEXANDRE, F. S. O.; SILVEIRA, E. R.; FERREIRA, J. M.; SOUSA, D. F.; GOMES, P. B.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; BRITO, S. M. R. C. Antidiabetic Activity of *Cissus verticillata* in Alloxan-Diabetic Rats. **Am. J. Agric. Sci. Biol.**, 2008. No prelo.

LINO, C. S.; SALES, T. P.; LEITE, C. P.; ALEXANDRE, F. S. O.; SILVEIRA, E. R.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Atividade hipoglicemiante e hipolipemiante da fração solúvel de *Cissus sicyoides*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 15., 2005, Águas de Lindóia. **Livro de resumo...**Águas de Lindóia: [s.n.], 2005.

LINO, C.S.; DIÓGENES, J. P. L.; PEREIRA, B. A.; ALVES, R. S.; FARIA, R. A. P.; VIANA, J. A.; ANDRADE NETO, M.; QUEIROZ, M. G. R.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata*. **Bio. Pharm. Bull.**, v.27, n. 1, p. 125-127, Jan. 2004.

LIU, Z.Q.; LUO, X.Y.; SUN, Y.X.; CHEN, Y.P.; WANG, Z.C. Can ginsenosides protect human erythrocytes against free-radical-induced hemolysis? **Biochem. Biophys. Acta**, v.1572, n. 1, p. 58-66, Aug. 2002.

LIZAMA, R. S.; MARTINEZ, M. M.; PÉREZ, O. C. Contribución al estudio de *Cissus sicyoides* L. (bejucoubi). **Rev. Cubana de Farm.**, v. 34, p. 120-124, 2000.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVAN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indometacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 221, n. 1, p. 261-267, Apr. 1982.

LOGANI, M. K.; DAVIS, R. E. Lipid peroxidation in biologic effects and antioxidants: a review. **Lipids**, v. 15, p. 485-493, 1979.

LOLLINGER, J. **Free radicals and food additives**. London: Taylor and Francis, 1981.

LOMBARDI, J. A. **Vitaceae. Generos *Ampelocissus*, *Ampelopsis* e *Cissus*.**: scientific names. 2000a. Disponível em: <<http://www.cissus.com.br>>. Acesso em: 2 Sept. 2008.

_____. Vitaceae – Gêneros *Ampelocissus*, *Ampelopsis* e *Cissus*. **Fl. Neotrop. Monogr.**, v.80, p.1-251, 2000b.

_____. *Cissus pinnatifolia* (Vitaceae), a new species from the Atlantic coast of Brazil, **Brittonia**, v. 54, n. 3, p. 175-177, 2000c.

_____. Two notable new species of *Cissus* (Vitaceae) from South America. **Brittonia**, v. 50, n.1, p. 19–22, 2000d.

LOW, T.; TONY, R.; BERESFORD, R. **Segredos e virtudes das plantas medicinais**. [S.l.]: Plants Readers Digest Livros, 1994.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUH, N. J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Bio. Chem.**, v.193, p.40-44, 1951.

MAEDA, A.; GOTO, M.; ZHANG, J.; BENNET, W.; GROTH, C.G.; KORSGREN, O. *et al.* Immunosuppression with FTY720 and cyclosporine A inhibits rejection of adult porcine islet xenografts in rats. **Transplantation**, v.75, p. 1409–1414, 2003.

MAEHLY, A.C.; CHANCE, B., The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-359, 1954.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MUNAOKO, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y.. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. **Exp. Anim.**, v. 29, p.1–13, 1980.

MAKKU, L. Epidemiology of diabetic dyslipidemia. **Diabetes Rev.**, v. 3, p. 408-422, 1995.

MAREE, A.; PEER, G.; IAINA, A.; BLUM, M.; WOLLMAN, Y.; CSERNIHOVSKY, T.; SILVERBERG, D. S.; CABILI, S. Nitric oxide in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. **Clin. Sci.**, v. 90, p. 379-384, 1996.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytochemistry**, v. 2, p. 137-189, 1995.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; ANDREANE, F.; PRESTES, D.; BALZ MIRON, D. V.; MORSCH, A. *et al.* Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos Extrato da casca de *Syzygium*

cumini no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Cienc. Rural**, v. 33, n. 6, p.1061-1065, nov./dez. 2003.

MCCANCE, D. R.; HANSON, R. L.; CHARLES, M. A.; JACOBSSON, L.T.H.; PETTIT, D.J.; BENNETT, P.H. *et al.* Comparison of tests for glycated haemoglobin and fasting and twohour plasma glucose concentration as diagnostic methods for diabetes. **BMJ**, v. 308, p. 1323-1328, 1994.

MCCARSO, K. E.; GOLDSTEIN, B. D. Time course of the alteration in dorsal horn substance P levels following formalin: blockage by naloxone. **Pain**, v. 41, p. 95-100, 1990.

MECK, J. V.; MARTIN, D. S.; D'AUNNO, D. S.; WATERS, W. W. Pressor response to intravenous tyramine is a marker of cardiac, but not vascular, adrenergic function. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 41, p. 126-131, 2003.

MEDEIROS A.C.C.; LACERDA, A. M. R.; VALE, T. G.; VIANA, G. S. B. Efeitos analgésicos do extrato aquoso de *Cissus sicyoides* L. *In*: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 17., 2002, Cuiabá. **Resumos...**Cuiabá: [s.n.], 2002.

MEHTA, M.; KAUR, N.; BHUTANI, K. K. Determination of marker constituents from *Cissus quadrangularis* LINN and their quantification by HPTLC and HPLC. **Phytochem. An.** v. 12, p. 91-95. 2001.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MENDONÇA, M. R. K. **Atividade antidiabética de *Bauhinia unguolata***: papel dos inositóis componentes mediadores putativos da ação da insulina. 2004. Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

MENSAH-BROWN, E. P.; STOSIC GRUJICIC, S.; MAKSIMOVIC, D.; JASIMA, A.; SHAHIN, A.; LUKIC, M. L. Downregulation of apoptosis in the target tissue prevents low-dose streptozotocin-induced autoimmune diabetes. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 941-946, 2002.

MEHRING J. VON; MINKOWSKI, O. Diabetes mellitus nach pankreasextirpation. **Archives of Experimental Pathology**, v. 26, p.371-387, 1890.

MIURA, T.; ITOH, Y.; IWAMOTO, N.; KATO, M.; ISHIDA, T. Suppressive activity of fruit of *Momordica charantia* with exercise on blood glucose in type 2 diabetic mice. **Bio. Pharm. Bull.**, v.27, p.248-250, 2004.

MODESTO-FILHO, J. Avaliação pré-clínica e clínica da atividade hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* L. (pata-de-vaca). *In*: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 1988, São Paulo. **Resumos...** São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1988. p. 47.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxid: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.**, v, 21, p. 361-374, 1991.

MONTILLA, M. P.; CABO, J.; NAVARRO, M. C.; RICO, S.; JIMENEZ, R. S.; ANEIROS, J. The protective and curative action of *Withania frutescens* leaf extract against CCL4 induced hepatotoxicity. **Phytotherapy Res.**, v. 4, p. 212-215, 1990.

MORIN, N.; VISENTIN, V.; CALISE, D.; MARTI, L.; ZORZANO, A.; TESTAR, X. *et al.* Tyramine stimulates glucose uptake insulin-sensitive tissues *in vitro* and *in vivo* via its oxidation by amine oxidases. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 303, n. 3, p.1238-1247, Dec.2002.

MORRISON, E. Y. A.; WEST, M. A. A Preliminary Study of effects of some Indian medicinal plants on blood sugar levels in the dog. **West Indian Med. J.**, v. 31, p. 194-197, 1982.

MORS, W. B.; RIZZINE, C. T.; PEREIRA, N. A. **Medicinal plants of Brazil**. Algonac, Michigan: Reference Publications, 2000.

MOSSA, J. S. A study on the crude antidiabetic drugs used in Arabian folk medicine. **Int. J. Crude Drug. Res.**, v. 23, p.137-145, 1985.

MRIALLES, F.; PORTHA, B. Early development of β -cells is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes. **Diabetes**. v.50, p.84-88, 2001

MULLER, A.; SCHOTT-OHLY, P.; DOHLE, C.; GLEICHMANN, H. Differential regulation of Th1-type and Th2-type cytokine profiles in pancreatic islet cells of C57/BL6 and BALB/c mice by multiple low doses of streptozotocin. **Immunobiology**, v. 205, p. 35-50, 2002.

MURAKAWA, Y.; ZHANG, W.; PIERSON, C.R.; BRISMAR, T.; OSTENSON, C. G. Efendic S *et al.* Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the GK rat causes peripheral neuropathy. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v.18, p. 473-483, 2002.

MURAT, J. C.; SERFATY, A. Simple Enzimatic Determination of Polysaccharide (Glycogen) Content of Animal Tissues. **Clin. Chem.**, v. 20, n. 12, p. 1576-1577, 1974.

MUSCELLI, E.; MINGRONE, G.; CAMASTRA, S.; MANCO, M.; PEREIRA, J.A.; PAREJA J.C. *et al.* Differential effect of weight loss on insulin resistance in surgically treated obese patients. **Am. J. Med.**, v.118, p.51-57, 2005.

NAGARJAN, S.; JAIN, H. C.; AULAKH, G. S. **Indigenous Plants Used in the control of diabetes**. New Delhi : Publication and Information Directorate CSIR, 1987.

NAIK, S. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DHULEY, J. N. Probable mechanism of hypoglycemic activity of bassic acid, a natural product isolated from *Bumelia sartorum*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 33, p. 37-44, 1991.

NAKAMURA, M.; YAMADA, K. Studies on a diabetic (KK) strain of the mouse. **Diabetologia**, v. 3, p. 121-221, 1967.

- NAMMI, S.; BOINI, M. K.; LODAGALA, S. D.; BEHARA, R. B. S. The juice of fresh leaves of *Catharanthus roseus* Linn. Reduces blood glucose in normal and alloxan diabetic rabbits. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 3, p.1-4, 2003.
- NANTEL, F.; DENNIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K. M.; CHAN, C.C.; Distribution and regulation of ciclooxigenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **Br. J. Pharmacol.**, v.128, p. 853- 859, 1999.
- NARENDHIRAKANNAN, R.T.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Biochemical Evaluation of Antidiabetogenic Properties of Some Commonly Used Indian Plants on Streptozotocin-Induced Diabetes in Experimental rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.33, n. 12, p.1150-1157, 2006.
- NEAME, P. B.; PILLAY, V. K. G. Spontaneous hypoglycemiae, hepatic and renal necrosis following the intake of herbal medicines. **S. Afr. Med. J.**, v. 30, p. 729-732, 1964.
- NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 41, n.2, p.12-130, 2005.
- NELSON, D. A.; AGUILAR-BRYAN, L.; RAEF, H.; BOYD, A. Molecular mechanisms of sulphonylurea in the pancreatic beta-cells. In: FLATT, P. R. (Ed.). **Nutrient regulation of insulin secretion**. London: Portland Press, 1992. p.319-340.
- NOGUEIRA, D. G.; PEREIRA, N. A. Atividade inibidora da absorção intestinal da glicose do epicarpo da romã (*Punica granatum* L.). **Rev. Brasil. Farmácia.**, v. 67, p. 129-134, 1986.
- NOGUEIRA, F. N. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em glândulas salivares de ratos diabéticos**. 2004. 71 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- NOITE, M. S.; KARAM, J. H. Pancreatic hormones & antidiabetic drugs. In: KATZUNG, B.G. **Basic and clinical pharmacology**. 10th ed. [S.l]: McGraw Hill Medical, 2007. p. 683-723.
- NOVO medicamento para diabetes. **Saúde News Journal**. 2007. Disponível em:<<http://www.saudenews.com/>>. Acesso em: 2 set. 2007.
- OBERLEY, L.W. Free radical and diabetes. **Free Radic. Bio. Med.**, v.5, p.113-124, 1988.
- OIKINE, R.; BERNBAUM, M.; MOORADIAN, A. D. A Critical Appraisal of the Role of Insulin Analogues in the Management of Diabetes Mellitus. **Drugs**, v.65, n. 3, p.325-340, 2005.
- OKYAR, A.; CAN, A.; AKEV, N.; BAKTIR, G.; SUTLÜPINAR, N. Effect of *Aloe vera* leaves on the blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. **Phytother. Res.**, v.15, p. 157-161, 2001.
- OLIVEIRA, J. E. P.; MILECH, A. (Ed.). **Diabetes mellitus: clínica, diagnóstico e tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Atheneu, 2004.

OLIVEIRA, J. E. P.; MONTEIRO, J. B. R.; ARAÚJO, C. G. S. **Diabetes mellitus Tipo 2: terapêutica clínica prática**. Rio de Janeiro: Med Line, 2003.

OLIVER-BEVER, B. Plants with oral hypoglycaemic action. **Crude Drugs Res.**, v.17, p. 139-196, 1979.

ONYECHI, U. A.; JUDD, P. A.; ELLIS, P. R. African plant foods rich in non-starch polysaccharides reduce post-prandial blood glucose and insulin concentrations in health human subjects. **Brit. J. Nutr.**, v. 80, p. 419-428, 1998.

ORTIZ, M.I.; CASTAÑEDA-HERNANDEZ, G.; GRANADOS-SOTOS, V. Possible involvement of potassium channel in peripheral antinociception induced metamizol: lack of participation of ATP-sensitive K⁺ channels. **Pharmacol. Biochem. Behavior**, v. 74, p. 465-470, 2003.

OTSHUDI, A. L.; FORIERS, A.; VERCRUYSSSE, A.; VAN ZEEBROECK, A.; LAUWERS, S. *In vitro* anti-microbial activity of six medicinal plants traditionally used for the treatment of dysentery and diarrhea in Democratic Republic of Congo (DRC). **Phytomedicine**, v. 7, p.167-172, 2000.

PAGE, C.; CURTIS, M.; SUTTER, M.; WALKER, M.; HOFFMAN, B. A drogas e os sistemas Endócrino e Metabólico. *In*: WALKER, M.; CURTIS, M.; HOFFMAN, B.; PAGE, C.; SUTTER, M. **Farmacologia integrada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2004. cap.15, p.292-300.

PALMER, J. P.; ASPLIN, C. M.; CLEMONS, P.; LYEN, K.; TATPATI, O.; RAGHU, P. K.; PAQUETTE, T. L. Insulin antibodies in insulin-dependent iabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, n. 4630, p. 1337-1339, Dec. 1983.

PANTHONG, A.; SUPRADITAPORA, W.; KANJANAPOTHI, D.; TAESOTIKUL, T.; REUTRAKUL. Analgesic, anti-inflammatory and venotonic effects of *Cissus quadrangularis* Linn. **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, n. 2, p. 264-270, Mar. 2007.

PARI, L.; MAHESWARI, J. U. Hypoglycemic effect of *Musa sapientum* L. in alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 68, p.321-325, 1999.

PARULKAR, A. A.; PEDERGRASS, M. L.; GRANDA-AYALA, R.; LEE, R.T.; FONSECA, V.A. Non-hypoglycemic effects of thiazolidinediones. **Ann. Intern. Med.**, v. 134, p. 61-71, 2001.

PEARCE, H. Medicinal chemistry of bisindole alkaloids from *catharanthus*. **The alkaloids**, v. 37, p.145-203, 1990.

PEPATO, M.T.; BAVIERA, A. M.; VENDRAMINI, R. C.; PEREZ, M. P. M. S.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin diabetic rats. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 37, p.15-20, 2003.

PEPATO, M.T.; FOLGADO, V. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf on rat decoction on rat streptozotocin diabetes. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 34, p.389-395, 2001.

PERGUNTAS e respostas-Glucoavance: portal diabetes. Merck, 2006. Disponível em:<<http://www.diabetes.com.br/>>. Acesso em: 11 nov. 2007.

PETRY, C. J.; DORLING, M. W.; PAWLAK, D. B.; OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. **Int. J. Exp. Diabetes Res.**, v. 2, p.139–143, 2001.

PHILLIPS, M. S.; LIU, Q.; HAMMOND, H.A.; DUGAN, V.; HEY, P.J.; CASKEY, C.T. *et al.* Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. **Nat. Genet.**, v. 13, n. 1, p. 18–19, May 1996.

PINEDA M. **Hacia una Farmacopea Caribena, Honduras.** Antioquia, Colômbia: Editorial Enda-Caribe, U.A.G/U., v. 4, p. 105-106. 1989

PLANK, J.; WUTTE, A.; BRUNNER, G.; SIEBENHOFER, A.; SEMLITSCH, B.; SOMMER, R. *et al.* A direct comparison of insulin aspart and insulin lispro in patients with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 25, n. 11, p.2053-2057, Nov. 2002.

POLYZOGOPOLOU, E. V.; KALFARENTZOS, F.; VAGENAKIS, A. G.; ALEXANDRIDES, T. K. Restoration of euglycemia and normal acute insulin response to glucose in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery. **Diabetes**, v. 52, p. 1098-1103, 2003.

PORCELLATI, F.; ROSSETTI, P.; PAMPANELLI, S.; FANELLI, C.G.; TORLONE, E.; SCIONTI, L. *et al.* Better longterm glycaemic control with the basal insulin glargine as compared with NPH in patients with type 1 diabetes mellitus given meal-time lispro insulin. **Diabetic Medicine**, v. 21, p. 1213-1220, 2004.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw in biphasic age-weight dependent and display differential nitric oxid ciclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, p.331-338, 2004.

PRINCE, P.S.M.; KAMALAKKANNAN, N.; MENON, V.P. *Syzigium cumini* seeds extracts reduce tissue damage in diabetic rat brain. **J. Ethnopharmacol.**, v. 84, p.205-209, 2003.

PUERTA, R. Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine. **J. Ethnopharmacol.**, v.1, p. 395-400, 2000.

QUILEZ, A. M.; SAENZ, M.T.; GARCIA, M. D.; DE LA PUERTA, R. Phytochemical analysis and anti-allergic study of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 56, p. 1185-1189, 2004.

- RABIN, D. U.; PLEASIC, S. M.; SHAPIRO, J. A.; YOO-WARREN, H.; OLES, J.; HICKS, J. M. *et al.* Islet cell antigen 512 is a diabetes-specific islet autoantigen related to protein tyrosine phosphatases. **J. Immunol.**, v. 152, n. 6, p. 3183-3188, Mar.1994.
- RAIMOND, L.; BANCHELLI, G.; SGROMO, L.; PIRISINO, R.; NER, M.; PARINI, A. *et al.* Effect of prolonged treatment with tyramine on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Physiol. Biochem.**, v. 59, p. 225-232, 2003.
- RAJASEKARAN, S.; SIVAGNANAM, K.; RAVI, K.; SUBRAMANIAN, S. Hypoglycemic effect of Aloe vera gel on streptozotocin-induced diabetes in experimental rats. **J. Med. Food**, v. 7, n. 1, p. 61-66, Spring 2004.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RAPHAEL, K. R.; SABU, M. C.; KUTTAN, R. Hypoglycemic effect of methanol extract of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn on alloxan induced diabetes mellitus in rats and its relation with antioxidant potential. **Indian J. Exp. Bio.**, v. 40, n. 8, p. 905-909, 2002.
- RAZA, H.; AHMED, I.; JOHN, A.; SHARMA, A. K. Modulation of xenobiotic metabolism and oxidative stress in chronic streptozotocin induced diabetic rats fed with *Momordica charantia* fruit extract. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, v. 3, p.131-139, 2000.
- REAGAN, L. P.; MAGARINOS, A. M.; MCEWAN, B. S. Neurological changes induced by stressing streptozotocin diabetic rats. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 893, p. 126–137, 1999.
- REES, D. A.; ALCOLADO, J. C. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic Med.**, v.22, n. 4, p. 359–370, Apr. 2005.
- RELLIER, N.; RUGGIERO-LOPEZ, D.; LECOME, M.; LAGARD, M.; WIERNSPERGER, N. In vitro and in vivo alterations of enzymatic glycosylation in diabetes. **Life Sci.**, v.64, p.1571-1583, 1999.
- REPORT of the Expert Committee on Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.**, v. 20, n. 7, p. 1183-1197, July 1997.
- REUSENS, B.; REMACLE, C. Intergenerational effect of an adverse intrauterine environment on perturbation of glucose metabolism. **Twin Res.**, v. 4, p. 406–411, 2001.
- RIDDLE, M.; ROSENSTOCK, J.; GERICH, J. The Treat-to-target trial: randomized addition of glargine or human NPH insulin to oral therapy of type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 26, n. 11, p. 3080-3086, Nov. 2003.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996.
- RODRIGUES, A. R. A.; DUARTE, I. D. G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K channels. **Br. J. Pharmacol.**, v.129, p. 110-114, 2000.

- ROEDER T.; SEIFERT, M.; KAHLER, C.; GEWECKE, M. Tyramine and octopamine: antagonistic modulators of behavior and metabolism. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 54, p. 1-13, 2003.
- ROSENSTOCK, J.; CAPPELLERI, J. C.; BOLINDER B.; GERBER, R. A. Patient satisfaction and glycemic control after 1 year with inhaled insulin (Exubera) in patients with type 1 or type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p.1318-1323, 2004.
- SABU, M. C.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **J. Ethnopharmacol**, v. 81, p. 155-160, 2002.
- SAENZ, M.T.; GARCIA, M. D.; QUILEZ, A.; HUMADA, M. C. Cytotoxic activity of *Agave intermixtya* L. (Agavaceae) and *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Phytother. Res.**, v. 14, p. 552-554, 2000.
- SAID, O.; KHALIL, K.; FULDER, S.; AZAIZEH, H. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 251-265, 2002.
- SALES T. P.; LINO, C. S.; MAGALHÃES, J. F.; OLIVEIRA, F. S. A.; BASTOS, V. R.; SILVEIRA, E. R. *et al.* Atividade Hipoglicemiante e Hipolipemiante da Fração Semi-Purificada de *Cissus Sicyoides*. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 21., 2005, Fortaleza. **Livro de resumos...**Fortaleza: [s.n.], 2005.
- SALES, T. P.; LINO, C. S.; OLIVEIRA, F. S. A.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B. Avaliação da Atividade Hipoglicemiante de *Cissus Sicyoides*. In: ENCONTRO UNIVERSITÁRIO DE INICIAÇÃO À PESQUISA, 23., 2004, Fortaleza. **Livro de Resumos...**Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2004.
- SALGADO, H. C.; FAZAN JUNIOR, R.; VAZAN, V. P.; Da SILVA, V. J.; BARREIRA, A.A. Arterial baroreceptors and experimental diabetes. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 940, p. 20–27, 2001.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, 2001.
- SANDLER, S.; SWENNE, I. Streptozotocin, but not alloxan, induces DNA repair synthesis in mouse pancreatic islets in vitro. **Diabetologia**, v. 25, p. 444-447, 1983.
- SATIN, L. S. New mechanisms for sulphonylurea control of insulin secretion. **Endocrine**, v. 4, p.191-198, 1996.
- SATO, Y.; AIZAWA, T.; KOMATSU, M.; OKADA, N.; YAMADA, T. Dual functional role of membrane depolarization Ca^{2+} influx in rat pancreatic beta-cell. **Diabetes**, v. 41, p. 438-443, 1992.

- SCHMITTA, A.; SCHMITTB, J.; MÜNCHC, G. & GASIC-MILENCOVICA, J. Characterization of advanced glycation end products for biochemical studies: side chain modifications and Xuorescence characteristics. **Anal. Biochem.**, v. 338, p. 201–215, 2005.
- SCHOENFELDER, T.; CIRIMBELLI, T. M.; CITADINI-ZANETTE, V. Acute effect of *Trema micrantha* (Ulmaceae) on serum glucose levels in normal and diabetic rats. **J. Ethnopharmacol**, v.107, n. 3, p. 456-459, Oct. 2006
- SEMGUPTA, A.; GHOSH, S.; BHATTACHARRJEE, S. Allium vegetables in cancer prevention an overview. **Asian Pac. J. Cancer Prev.**, v. 5, p. 237-245, 2004.
- SENANAYAKE, G. G. K.; MARAYAMA, M.; SHIBUYA, K.; SAKONO, M.; FUKUDA, N.; MORISHITA, Y. *et al.* The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 257-262, 2004.
- SERVICE, F. J. Hypoglycemic disorders. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, v.28, p. 467, 1999
- SETTER, S. M.; ILTZ, J. L.; THAMS, J.; CAMPBELL, R. K. metformin hydrochloride in treatment of type-2 diabetes mellitus: a clinical review with a focus on dual therapy. **Clin. Ther.**, v. 25, p. 2991-3026, 2003.
- SHARMA, S. R.; DWIVEDI, S. K.; SWARUP, D. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Cesalpinia bounducella* seeds in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 58, p. 39-44, 1997.
- SHIMADA, S.; TANAKA, Y.; OHMURA, C.; TAMURA Y.; SHIMIZU, T.; UCHINO, H. *et al.* N-(carboxymethyl)valine residues in hemoglobin (CMV-Hb) reflect accumulation of oxidative stress in diabetic patients. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 69 , n. 3, p. 272-278, Sept. 2005.
- SHIRWAIKAR, R.; RAJENDRAN, K.; DINESH, K. C. Andiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin-nicotinamide type 2 diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91 , p. 171-175, 2004.
- SILVA, G. A. **Caracterização e padronização farmacológica da droga e extrato fluido de *Cissus sycioides* L.** 1995. 82 p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1995.
- SILVEIRA, E. R. **Detalhe dos ramos com flores de *Cissus verticillata*.** 2005. Fotografia digital
- _____. **Detalhe dos ramos com frutos jovens de *Cissus verticillata*.** 2005. Fotografia digital.
- _____. **Detalhe dos frutos jovens de *Cissus verticillata*** 2005. Fotografia digital.
- _____. **Detalhe dos frutos maduros de *Cissus verticillata*.** 2005. Fotografia digital.
- _____. ***Cissus verticillata* com aspecto que justifica o nome popular “cortina-de-pobre”.** 2005. Fotografia digital.

SILVESTRE, J. A. **Hospitalizações SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 1997.

SING, B.; MALLIKA, V.; GOSWAMI, B. Metabolic syndrome: Diagnosis, potential markers and management-an update. **Clin. Chim. Acta**, v. 1, p. 1, 2006.

SING, S. P.; MISRA, N.; DIXIT, K. S.; SING, N.; KOHLI, R. P. An experimental study of analgesic activity of *Cissus quadrangularis*. **Indian J. Pharmacol.**, v.16, p.162-163, 1984.

SLIGHT, S. H.; FEATHER, M. S.; ORTWERTH, B. J. Glycation of lens proteins by the oxidation products of ascorbic acid. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1038, n. 3, p. 367-374, May 1990.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). **Posicionamentos oficiais**: Posicionamento n. 2: indicações de análogos de insulina de ação rápida e prolongada e de insulina inalável no tratamento do diabetes tipo 1 e tipo 2. [S.l.], 2006a.

_____. **Atualização brasileira sobre diabetes: síndrome metabólica**. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2005.

_____. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. **Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2**. 2002. 73 p.

_____. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus**: diretrizes. 2006b.

SONE, H.; KAWAKAMI, Y.; OKUDA, Y.; SEKINE, Y.; HONMURA, S.; MATSUO, K. *et al.* Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. **Diabetologia**, v. 40, p.726-730, 1997.

SPICHLER, E. R. S.; SPICHLER, E. S.; SPICHLER, D.; MARTINS, C. S. F.; FRANCO, L. J.; LESSA, I. Diabetic lower extremities amputation-Rio de Janeiro, BR. 1990-1996. **Diabetologia**, v. 41, p. 90-96, 1998.

SRIDHAR, S. B.; SHEETAL, U. D.; PAI, M. R. S. M.; SHASTRI, M. S. Preclinical evaluation of the antidiabetic effect of *Eugenia jambolana* seed powder in streptozotocin-diabetic rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 463-468, 2005.

STRACK, T. R. Inhaled Human Insulin. **Drugs Today (Barc.)**, v. 42, n. 4, p. 207-221, Apr. 2006.

SZWERGOLD, B. S.; HOWELL, S.; BEISSWENGER, P. J. Nonenzymatic glycation/enzymatic decylation: a novel hypothesis on the etiology of the diabetic complications. **Int. Congress Series**, v. 2545, p. 143-152, 2002.

TASKINEN, M. R.; BELTZ, W. F.; HARPER, I. Effects of non-insulin dependent diabetes mellitus on VLDL triglyceride and apolipoprotein B metabolism: studies before and after sulfonylurea therapy. **Diabetes**, v. 35, p.1268-1277, 1986.

TEIXEIRA, C. C.; RAVA, C. A.; da SILVA, P. M.; MELCIOR, R.; ARGENTA, R.; ANSELMINI, F. *et al.* Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. **J. Ethnopharmacol.**, v.71, p.343-347, 2000.

THORAND, B.; LOWEL, H.; SCHNEIDER, A.; KOLO, H.; MEISINGER, C.; FROHLICH, M.; KOENING, W. C-Reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men. **Arch. Intern. Med.**, v.163, n. 1, p. 93-99, Jan. 2003.

TIKKAINEN, M.; HAKKINEN, A. M.; KORSHENINNIKOVVA, E.; TUULIKKI, N.; SARI, M.; YKI-JARVINEN, H. Effects of rosiglitazone and metformin on liver fat content, hepatic insulin resistance, insulin clearance, and gene expression in adipose tissue in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 2169-2176, 2004

TJOLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, n. 1, p. 5-17, Oct. 1992.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; MCDEVITT, H. O. HLA-DQb gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, v. 329, p. 599-604, 1987.

TOLEDO, M.; REYES, F.; LADROZA, F.; FRANCIS, F.; DRAETTAO, S. Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides* L.). **J. Food Sci.**, v. 48, p. 1368-1369, 1983.

TOMLINSON, A.; APPLESON, I.; MOOREGILROY, A.R.; WILLIS, D.; MITCHELL, J.A.; WILLOUGHBY, A. Ciclo-oxygenase and oxide-nitric isoforms in rat carrageenan induced pleurisy. **Br. J. Pharmacol.**, v.113, p. 693-698, 1994.

TREJO-GONZALEZ, A.; GABRIEL-ORTIZ, G.; PUEBLA-PEREZ, A. M.; HUIZAR-CONTRERAS, M. D.; MUNGUIA-MAZARIEGOS, M. R.; MEJIA-ARREGUIN, S.; CALVA, E. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 55, p. 27-33, 1996.

TRIMBLE, E. R.; KARAKASH, C.; MALAISSE-LAGAE, F.; VASSUTINE, I.; ORCI, L., RENOLD, A. E. Effects of intraportal islet transplantation on the transplanted tissue and recipient pancreas. I. Functional studies. **Diabetes**, v. 29, p.341-347, 1980.

TRINDER, P. Determination of glucose using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Ann.Clin. Biochem.**, v. 6, p.24-27, 1969.

TRIVEDI, N. A.; MAZUMDAR, B.; BHATT, J. D.; HEMAVATHY, K. G. Effect of shilajit on the blood glucose and lipid profile in alloxan-induced diabetic rats. **Indian J. Pharmacol.**, v.36, p.373-376, 2004.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTRÖM, J.; ERIKSSON, J. G.; VALLE, T. T.; HÄMÄLÄINEN, H.; ILANNE-PARIKKA, P. *et al.* For The Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 18, p.1343-1350, May 2001.

TURK, J.; CORBETT, J. A.; RAMANADHAN, S.; BOHRER, A.; MACDANIEL, M. L. Biochemical evidence for nitric oxid formation from streptozotocin an isolated pancreatic islets. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.197, p.1458-1464, 1993.

UEDA, H.; IKEGAMI, H.; YAMATO, E.; FU, J.; FUKUDA, M.; SHEN, G. *et al.* The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity. **Diabetologia**, v. 38, p.503–508, 1995.

UGOCHUKWU, N. H.; COBOURNE, M. K. Modification of renal oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with extracts from *Gongronema latifolium* leaves. **Clin. Chim. Acta**, v. 36, p. 73-81, 2003.

UK Prospective Diabetes Study Group. (UKPDS 33). Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet**, v.352, n. 9131, p. 837-853, Sep. 1998.

UK Prospective Diabetes Study Group. (UKPDS 24). A 6-year, randomized, controlled trial comparing sulfonylurea, insulin, metformin therapy in patients newly diagnosed type 2 diabetes that could not be controlled with diet therapy. **Ann. Intern. Med.**, v.128, p. 165-167, 1988.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas Medicinais da Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.

VANDENBERG, C. M.; BLOB, L. F.; KEMPER, E. M.; AZZARO, A. J. Tyramine pharmacokinetics and reduced bioavailability with food. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 43 , p. 604-609, 2003.

VIANA, G. S. B.; MEDEIROS, A. C. C.; LACERDA, A. M. R.; LEAL, L. K. A. M.; VALE, T. G.; MATOS, F. J. A. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacol.**, v. 4 , n. 1, p. 1-7, June 2004.

VIEIRA, L. S. Fitoterapia da Amazônia. In: _____. **Manual de plantas medicinais**. São Paulo: Ed. Agr. Ceres, 1992. p.350.

VIKRANT, V.; GROVER, J. K.; TANDON, N.; RATHI, S. S.; GUPTA, N. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 76, p. 139-143, 2001.

VISENTIN, V.; MARQ, P.; BOUR, S.; SUBRA, C.; PREVOT, D.; MORIN, N.; VALET, P.; MONJE, M. C.; NEPVEU, F.; CARPENE, C. Effect of prolonged treatment with tyramine on glucose tolerance in streptozotocin-induced diabetic rats. **J. Physiol. Biochem.**, v. 59, n. 3, p. 225-232, Sept. 2003.

VISENTIN, V.; PREVOT, D.; MARTI, L.; CARPENE, C. Inhibition of rat cell lipolysis by monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 466 , p. 235-243, 2003.

VIVOLO, M. A.; FERREIRA, S. R. G.; SUSTOVICH, C. Experiência com colônia de férias para jovens diabéticos: proposta de educação e aperfeiçoamento profissional. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v.37, p.64-68, 1993.

VOLPATO, G. T.; DAMASCENO, D. C.; CALDERON, I. M. P.; RUDGE, M. V. C. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 4, p.35-45, 2002.

WAGNER, W. L.; HERBST, D. R.; SOHMER, S. H. **Manual of the flowering plants of Hawaii**. Honolulu: University of Hawaii Press, 1999.

WANG, H. H.; RONDU, F.; LAMOURI, A.; DOKHAN, R.; MARC, S.; TOUBOUL, E. *et al.* Effect of S-21663 (PMS 812), an imidazoline derivative, on glucose tolerance and insulin secretion in rat model of type II diabetes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 278, n. 1, p.82-89, July 1996.

WENIGER B.; SABARY H.; SATURNY. Tri-phytochimique de 4 plantes de la liste. *In*: PINEDA M. **Hacia una Farmacopea Caribena, Honduras**. Antioquia, Colômbia: Editorial Enda-Caribe, U.A.G/U., 1989. v. 4, p. 105-106.

WENBERG, L.; SONG, Z.; BENNET, W.; ZHANG, J.; NAVA, S.; SUNDBERG, B. *et al.* Diabetic rats transplanted with adult porcine and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycaemic for up to 100 days. **Transplantation**, v.71, p.1024–1033, 2001.

WENIGER, B.; SABARY, H.; SATURNY, A. **Tri-phytochimique de 4 plantes de la liste TRAMIL**. Caribe, UAG/U Antioquia, Colômbia, 1984..

WHAIEB, S. A. H₂O₂ exposure during pregnancy: the effect of vitamin C against oxidative stress in the offspring of rats. **Iraqi J. Vet. Sci.**, v. 6, p. 98-101, 1993.

WHITE, N. H.; CLEARY, P. A.; DAHMS, W.; GOLDSTEIN, D.; MALONE, J.; TAMBORLANE, W. V. Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **J. Pediatr.**, v.139, n. 6, p. 804-812, Dec. 2001.

WILSON, P.W.F. High density lipoprotein, low density lipoprotein and coronary heart disease. **Am. J. Cardiol.**, v.66, p. 7A-10A, 1990.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.11, p. 544-547, Dec. 1962.

WOLFF, S. P.; DEAN, R.T. Glucose autooxidation and protein modification. **Biochem. J.**, v. 245, p.243-250, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**: report of a WHO consultation. Geneva, 1999.

_____. **WHO Monographs on selected medicinal plants:** report of a WHO study group. Geneva, 2002. (WHO Technical Report Series, WHO, v. 2).

WYNE, K. *et al.* The effects of rosiglitazone in poorly-controlled, drug-naive patients with type 2 diabetes mellitus. *In: ANNUAL MEETING OF ADA, 64th* , 2004, Orlando, FLA. **Proceedings...** Orlando, FLA: ADA, 2004.

YANG, Z.; CHEN, M.; FIALKOW, L.B.; ELLET, J.D.; WU, R.; NADLER, J. L. The novel anti-inflammatory compound, lisofylline, prevents diabetes in multiple low-dose streptozotocin-treated mice. **Pancreas**, v.26, p. 99–104, 2003.

YU, D.Y.; CRINGLE, S. J.; SU, E. N.; YU, P. K.; JERUMS, G.; COOPER, M.E. Pathogenesis and intervention strategies in diabetic retinopathy. **Clin. Exp. Ophthalmol.**, v.29, p. 164–166, 2001.

YU, J. G.; KRUSZYNSKA, Y. T.; MULFORD, M. I.; OLEFSKY, J. M. A Comparison of troglitazone and metformin on insulin requirements in euglycemic intensively insulin-treated type 2 diabetic patients. **Diabetes**, v. 48, p. 2414-2421, 1999.

ZANATTA, L.; De SOUSA, E.; CAZAROLLI, L. H.; JUNIOR, A. C.; PIZZOLATI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.**, v.109, n. 1, p. 151-155, Jan. 2007.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v.372, p. 425–432, 1994.

ZHAO, L.; LI, Z.; KULLIN, M.; BORG, L.A.H.; KARLSSON, F.A. Alterations in net glucose uptake and in the pancreatic B-cell GLUT2 transporter induced by diazoxide and secretory stimuli. **J. Endocrinol.**, v. 185, p. 291-299, 2005.

ZUCCOLLO, A.; NAVARRO, M.; FRONTERA, M.; CUEVA, F.; CARATTINO, M.; CATANZARO, O. L. The involvement of the kallikrein-kinin system in diabetes type 1 (insulinitis). **Immunopharmacology**, v. 45, p.69–74, 1999.

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](#)