



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS – NPPM
“Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
(NÍVEL MESTRADO)

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Cenostigma macrophyllum* NA
NEUROPATIA DIABÉTICA**

FERNANDA CERQUEIRA BARROSO DE CARVALHO

TERESINA
2009

FERNANDA CERQUEIRA BARROSO DE CARVALHO

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Cenostigma macrophyllum* NA
NEUROPATIA DIABÉTICA**

Dissertação submetida à coordenação do programa de Mestrado em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito
Co-orientador(a): Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

TERESINA
2009

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

C331a Carvalho, Fernanda Cerqueira Barroso de.
Avaliação dos efeitos de Cenostigma macrophyllum na neuropatia diabética [manuscrito] / Fernanda Cerqueira Barroso de Carvalho. – 2009.
81 f.

Cópia de computador (printout).
Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Farmacologia. “Orientadora Profª Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito”

1. Farmacologia 2. Diabetes Mellitus. 3. Neuropatia.
4. Hemoglobina Glicada. 5. Cenostigma macrophyllum I. Título.

CDD 615.1

FERNANDA CERQUEIRA BARROSO DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Cenostigma macrophyllum* NA
NEUROPATIA DIABÉTICA**

Esta dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca setorial da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que realizada de acordo com as normas da ética científica.

Data da aprovação: 14 de Julho de 2009

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito
(Orientadora)
Universidade Federal do Piauí

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP – USP

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida
Universidade Federal do Piauí

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem sua luz e proteção nada na minha vida seria possível. Ele é o Senhor e provedor de tudo, minha fortaleza e refúgio.

Aos meus pais que sempre se esforçaram para me proporcionar uma educação de qualidade, ao meu irmão pelo carinho e cumplicidade, à minha madrinha Ducarmo pela dedicação de mãe a mim atribuída, aos meus avós pelas orações e ao meu namorado Ruytemberg pela compreensão, amor e incentivo.

À minha orientadora:

Profa Salete, além de orientadora, minha mãe científica, a senhora é minha inspiração. Sempre tive o sonho de ser professora, e a senhora além de ter me orientado com toda paciência e compreensão no mestrado, ajudou-me intensamente na minha iniciação na vida docente. Muito obrigada por tudo!

Aos meus amigos do NPPM:

Luciane e Celyane minhas companheiras de todas as horas. Obrigada pelo apoio, incentivo e pela contribuição direta nos meus experimentos.

Ana Mara, obrigada pelo exemplo e por todos os ensinamentos que você me passou. Admiro-te demais e agradeço por tanta compreensão, afinal de contas foi você quem me recebeu no laboratório e me instruiu na bancada.

Aos colegas de laboratório, Viviane Amorim obrigada pela ajuda e aos dos demais laboratórios, representados na pessoa da Flávia Franceli que sempre estiveram prontos pra me ajudar.

Aos alunos Pibic, Gabriel, Viviane Ribeiro, Liviane, Caio e Rosana, mas principalmente Herton e Edson agradeço a contribuição nos meus experimentos, nos estudos e a paciência comigo em todos os momentos.

Seu Carlos obrigada pelo trabalho dedicado, pelo cuidado com nossos animais e pela amizade.

A todos os professores do mestrado agradeço por estarem sempre dispostos a nos ajudar e ensinar. Em especial, agradeço a Profa Dra Fernanda Regina de Castro Almeida pela ajuda e orientação no desenvolvimento das metodologias.

A Profa Aldeídia pelo exemplo e por estar sempre disponível a ajudar no que pode.

A todos os meus colegas do mestrado, principalmente:

Débora e Denise, obrigada pela amizade e companheirismo.

Maurício e Daniel, meus companheiros de grupo de seminário, obrigada pela ajuda no desenvolvimento das atividades e pela amizade. Daniel, agradeço também por ter me trazido para pesquisa, foi a sua influência que me fez descobrir esse mundo.

Serginho, meu amigo de linha de pesquisa e de laboratório desde que eu entrei no NPPM como aluna de iniciação científica, obrigada por tudo!

Agradeço à Profa Dra Mariana Helena Chaves e ao seu aluno de doutorado Charllyton pela contribuição com a obtenção e fracionamento do material vegetal utilizado.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FINEP agradeço o financiamento desse trabalho.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse sonho, muito obrigada!

Resumo

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE *Cenostigma macrophyllum* NA NEUROPATIA DIABÉTICA. Fernanda Cerqueira Barroso de Carvalho. Orientadora: Profa Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”, Universidade Federal do Piauí, 2009.

Cenostigma macrophyllum (caneleiro) é utilizada para doenças estomacais e intestinais. Estudos anteriores apontam efeitos inibitórios da glicação protéica em ratos diabéticos (D), atividade antiinflamatória e antinociceptiva. No presente trabalho, avaliamos a atividade da Fração Hidroalcoólica (FHA) e mistura de biflavonas (FM22S) obtidas das folhas de *Cenostigma macrophyllum* na neuropatia diabética. Utilizou-se ratos Wistar machos normais e diabéticos (induzidos com Estreptozotocina 40 mg/Kg i.v) para avaliar a hiperalgesia diabética medindo o limiar nociceptivo mecânico (LNM) através dos filamentos de von Frey. O tratamento com a FHA (125mg/Kg v.o, por 33 dias) não controlou a hiperglicemia. Os níveis séricos da uréia e creatinina dos animais D-FHA e D-veículo foram significativamente maiores que os do controle. A glicação *in vivo* da hemoglobina foi inibida em 16,1% e da frutossamina em 31,4% em ratos D-FHA. O grupo D-veículo apresentou redução do LNM na terceira semana após a indução do diabetes. Porém, nos ratos D-FHA, o LNM foi semelhante aos controles por todo período experimental. No tratamento agudo dos grupos diabéticos após 35 dias da indução do DM, observou-se aumento no LNM dos animais dos grupos D-FHA (500mg/Kg v.o) e D-morfina (5mg/Kg i.p) em relação aos do grupo D-veículo no tempo de 60 minutos da observação e se manteve aos 120 e 180 minutos para o D-morfina. A administração de dose única da fração FM22S (60mg/Kg v.o) aumentou o LNM em relação ao grupo D-veículo, 60 e 120 minutos após o tratamento. A atividade da catalase em camundongos tratados com FM22S (50mg/Kg v.o, 3 dias) e submetidos à lesão hepática pelo paracetamol (350mg/Kg v.o) foi 57,8% maior do que a dos tratados com veículo e paracetamol. Os dados indicam que a FHA das folhas de *Cenostigma macrophyllum* apresenta atividade inibidora da glicação protéica, e sugerem proteção contra o desenvolvimento da neuropatia dolorosa e efeitos antinociceptivo e antioxidante.

Palavras chaves: *Cenostigma macrophyllum*, neuropatia diabética, biflavonas

Abstract

ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF *Cenostigma macrophyllum* ON DIABETIC NEUROPATHY. Fernanda Cerqueira Barroso de Carvalho. Tutor: Profa Dra. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito. Master's Dissertation. Post-Graduate Course in Pharmacology. Centre for Research on Medicinal Plants "Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes", Federal University of Piauí, 2009.

Cenostigma macrophyllum (caneleiro) is used for stomach and intestinal diseases. Previous studies have shown the inhibitory effects of protein glycation in diabetic rats (D), as well as anti-inflammatory and antinociceptive activity. In this study, we evaluated the activity of the Hydroalcoholic Fraction (HAF) and a mixture of biflavones (FM22S) obtained from *Cenostigma macrophyllum* leaves on diabetic neuropathy. Normal and diabetic male Wistar rats (induced with Streptozotocin 40 mg/kg i.v.) were used to assess diabetic hyperalgesia by measuring the mechanical nociceptive threshold (MNT) by means of von Frey filaments. Treatment with the HAF (125mg/Kg v.o., for 33 days) failed to control hyperglycemia. Serum levels of urea and creatinine in D-HAF and D-vehicle animals were significantly higher than in the control. The *in vivo* glycation of hemoglobin was inhibited in 16.1% and fructosamine in 31.4% in D-HAF rats. Group D-vehicle had decreased MNT in the third week after induction of diabetes. However, in D-HAF rats, the MNT was similar to the control throughout the experimental period. Thirty-five days after induction of diabetes in the acute treatment of diabetic groups, there was an increase in MNT of the animals in groups D-HAF (500mg/Kg v.o.) and D-morphine (5 mg/kg i.p.) when compared with D-vehicle group at the time of 60 minutes of observation, and this remained at 120 and 180 minutes for the D-morphine. The administration of a single dose of FM22S fraction (60mg/kg v.o.) increased MNT when compared with D-vehicle group, 60 and 120 minutes after treatment. The catalase activity in mice treated with FM22S (50mg/Kg v.o., 3 days) and whose livers were damaged by paracetamol (350mg/Kg v.o.) was 57.8% higher than those treated with vehicle and paracetamol. The data indicate that the HAF in *Cenostigma macrophyllum* leaves has protein glycation inhibitory activity, and indicate protection against the development of painful neuropathy, as well as anti-nociceptive and antioxidant effects.

Key words: *Cenostigma macrophyllum*, diabetic neuropathy, biflavones

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	XVI
LISTA DE TABELAS	XVII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIX
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Coleta e obtenção do material vegetal	38
3.2 Tratamento crônico de ratos diabéticos com a fração hidroalcolica (FHA) de <i>Cenostigma macrophyllum</i>	41
3.2.1 – Animais e Indução do diabetes mellitus (DM)	41
3.2.2 – Avaliação dos efeitos da FHA em animais diabéticos	41
3.3 Tratamento agudo de ratos diabéticos com FHA e FM22S (fração semi-purificada da FHA das folhas - biflavonas).....	42
3.4 Avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora	42
3.4.1 Atividade da catalase	42
3.4.2 Determinação da glutathiona reduzida (GSH)	43
3.5 Análise estatística	44
4. RESULTADOS	46
4.1 Efeitos da FHA das folhas de <i>Cenostigma macrophyllum</i> em animais diabéticos.....	46

4.1.1 Glicemia, peso corpóreo, uréia, creatinina, frutossamina, albumina e hemoglobina glicada (HbA1c) de ratos diabéticos tratados com a FHA por 33 dias.....	46
4.1.2. Avaliação da neuropatia diabética e determinação do limiar nociceptivo mecânico	51
4.2 Avaliação do efeito antinociceptivo agudo da FHA em animais diabéticos.....	52
4.2.1. Efeito antinociceptivo agudo da FHA após 35 dias da indução do diabetes....	52
4.3 Avaliação do efeito antinociceptivo agudo da FM22S das folhas de <i>Cenostigma macrophyllum</i> em animais diabéticos.....	54
4.3.1. Determinação do limiar nociceptivo mecânico em ratos diabéticos tratados com morfina ou FM22S	54
4.4 Avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora da FM22S em <i>Mus musculus</i>	56
4.4.1. Relação entre os grupos de animais e as mortes ocorridas	56
4.4.2. Atividade da Catalase e quantificação da Glutathiona reduzida (GSH) hepáticas	57
5. DISCUSSÃO	60
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS	69

Lista de Figuras e Tabelas

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Foto da espécie <i>Cenostigma macrophyllum</i>	32
FIGURA 02: Detalhe dos ramos com flores de <i>Cenostigma macrophyllum</i>	32
FIGURA 03: Estrutura molecular da Agatisflavona	34
FIGURA 04: Estrutura molecular da Amentoflavona	34
FIGURA 05: Esquema de fracionamento fitoquímico de <i>Cenostigma macrophyllum</i> ..	39
FIGURA 06: Percentual da Hemoglobina Glicada (HbA _{1c}) de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA	50
FIGURA 07: Frutosamina sérica de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo e diabéticos tratados com FHA.....	50
FIGURA 08: Limiar nociceptivo mecânico de ratos controles e diabéticos tratados com Veículo ou FHA por 33 dias.....	51
FIGURA 9: Limiar nociceptivo mecânico (g) quinzenal de ratos controles e diabéticos	53
FIGURA 10: Limiar nociceptivo mecânico (g) de ratos diabéticos tratados com Morfina ou FHA no 35 ^o dia da instalação do diabetes.....	53
FIGURA 11: Limiar nociceptivo mecânico (g) quinzenal de ratos controles e diabéticos	55
FIGURA 12: Limiar nociceptivo mecânico (g) de grupos diabéticos tratados com dose Morfina ou FM22S no 35 ^o dia da instalação do diabetes	55
FIGURA 13: Níveis de catalase em animais controles e tratados com N- Acetilcisteína (NAC), FM22S e com Paracetamol	57
FIGURA 14: Níveis de GSH em animais controles e tratados com (NAC) 750mg/kg i.p FM22S e com Paracetamol	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Glicemia de jejum ratos controles e diabéticos antes e após o tratamento com FHA 125 mg/Kg,v.o das folhas de <i>Cenostigma macrophyllum</i> por 33 dias.....	46
TABELA 02: Peso corpóreo (g) de ratos controles e diabéticos antes e após o tratamento com Veículo ou FHA.....	47
TABELA 03: Uréia sérica de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA.....	48
TABELA 04: Creatinina sérica de ratos machos normais, diabéticos não tratados (veículo) e diabéticos tratados com FHA.....	48
TABELA 05: Albumina sérica de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA.....	49
TABELA 06: Frutosamina sérica e % Hemoglobina Glicada (HbA _{1c}) de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA.....	49
TABELA 07: Glicemia sérica de ratos não-diabéticos e diabéticos.....	52
TABELA 08: Glicemia sérica de ratos não-diabéticos e diabéticos.....	54
TABELA 09: Número de mortes em relação ao número de animais.....	56

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA: American Diabetes Association
- AGEs: produtos finais de glicação avançada
- AGL: Ácidos Graxos Livres
- ALEs: produtos finais de lipoperoxidação avançada
- AR: Aldose Redutase
- CCD: Cromatografia de camada delgada
- DCCT: Diabetes Control and Complications Trial
- DM: Diabetes mellitus
- DTNB: Ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico)
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EEtOH: Extrato Etanólico
- FHA: Fração Hidroalcoólica
- FM22S: Fração semi-purificada da FHA contendo a mistura de amentoflavona e agatisflavona obtida da partição do EEtOH das folhas
- GSH: Glutathiona Reduzida
- HbA_{1c}: Hemoglobina A_{1c}
- IGF: Fator de crescimento semelhante a insulina
- IR: Receptores de insulina
- IR-A: Receptor de insulina "A"
- IR-B: Receptor de insulina "B"
- i. v. : Intravenoso
- LDL: Lipoproteína de Baixa Densidade
- LNM: Limiar Nociceptivo Mecânico
- NAC: N-Acetilcisteína
- NF-κB: Fator Nuclear κB
- NGF: Fator de crescimento neuronal
- NPD: Neuropatia Periférica Diabética
- NPPM: Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais
- OMS: Organização Mundial de Saúde

- RD: Retinopatia Diabética
- RMN: Ressonância Magnética Nuclear
- SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes
- STZ: Estreptozotocina
- TCA: Ácido tricloroacético
- UKPDS: United Kingdom Prospective Diabetes Study
- v. o. : Via Oral

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM) inclui um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou em sua ação (THE EXPERT COMMITTEE, 1997). A hiperglicemia manifesta-se por sinais como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva ou por complicações agudas que podem levar a risco de vida: a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica. A hiperglicemia crônica está associada a dano, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP 33, 1998; The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993).

O DM acomete cerca de 7,6% da população brasileira entre 30 e 69 anos de idade, segundo estudos realizados em 1992 (MALERBI; FRANCO, 1992). Estudos mais recentes realizados em Ribeirão Preto sugerem um aumento nesse índice, visto que a prevalência de diabetes na população dessa cidade é de 12,1% (TORQUATO *et al*, 2003). Cerca de 50% dos pacientes desconhecem o diagnóstico e 24% dos pacientes reconhecidamente portadores de DM não fazem qualquer tipo de tratamento. As complicações crônicas do DM são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos (MALERBI; FRANCO, 1992).

O DM 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. No contexto da saúde pública, esta doença aparece como a sexta causa mais freqüente de diagnóstico primário para internação hospitalar e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2002). Os diabéticos representam cerca de 30% dos pacientes que se internam em unidades coronarianas intensivas com dor precordial (SILVESTRE, 1997) e cerca de 26% dos que ingressam em programas de diálise (BRUNO; GROSS, 2000). O que conduz estes pacientes à hemodiálise é a doença renal crônica causada pelo diabetes. No Brasil, o risco de desenvolvimento de nefropatia é de cerca de 30% nos diabéticos tipo 1 e de 20% nos diabéticos tipo 2 (ROMÃO JÚNIOR, 2004)

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS), Associação Americana de Diabetes (ADA) e recomendada pela Sociedade Brasileira de diabetes (SBD), inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e diabetes mellitus gestacional. Ainda existem duas categorias, referidas como prédiabetes, que são a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída. Essas categorias não são consideradas como doenças, mas fatores de risco para o desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

A grande maioria dos casos de diabetes recai em duas categorias etiopatogênicas. Na primeira categoria (Diabetes tipo 1), a causa é a absoluta deficiência na secreção de insulina. Indivíduos com propensão a desenvolver esse tipo de diabetes podem ser identificados por evidências sorológicas de um processo patológico autoimune contra as ilhotas β pancreáticas e por marcadores genéticos. Por outro lado, na segunda categoria (Diabetes tipo 2), a causa é a associação entre resistência à ação da insulina e uma resposta secretória inadequada da mesma. Nesta última classe, o grau de hiperglicemia é suficiente para causar mudanças patológicas e funcionais nos tecidos alvos, mas sem sintomas clínicos. Estes podem estar presentes por muito tempo sem que a doença seja detectada. Durante o período assintomático, é possível demonstrar alterações no metabolismo dos carboidratos através da dosagem da glicose sérica no estado de jejum ou pelo teste oral de tolerância à glicose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

Entre os tipos de diabetes além dos tipos clássicos está o diabetes mellitus gestacional que é a intolerância à glicose observada durante a gravidez. Nesta modalidade, a detecção de intolerância à glicose ocorre principalmente no terceiro trimestre da gestação. Existem também os demais tipos, aqueles em que a diabetes é causada por: defeitos genéticos das células β , MODY - diabetes do adulto de início em jovens, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, drogas ou indutores químicos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

O DM envolve o aparecimento de vários processos patogênicos. A deficiência da ação da insulina nos tecidos alvos resulta em uma série de anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. As alterações do metabolismo

celular contribuem para o agravamento da hiperglicemia, pois o organismo compensa a falta de glicose intracelular pela ativação da glicogenólise hepática, gliconeogênese e proteólise muscular. O estado hiperglicêmico é acompanhado de alterações no metabolismo lipídico com aumento da lipólise, da liberação de ácido graxos livres (AGL), da velocidade da β -oxidação de ácidos graxos e em certos casos da concentração de triglicerídeos e colesterol séricos (DEVLIN, 2007; NELSON; COX, 2002; BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2004).

Dentre as complicações crônicas do DM podemos citar a formação de catarata e a retinopatia com perda de visão associada. A retinopatia diabética (RD) acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de cegueira em pacientes entre 25 e 74 anos nos Estados Unidos (GROSS; NEHME, 1999). O DM é também a causa principal de amputações de membros inferiores (SPILCHLER; SPICHLER; MARTINS, 1998).

As alterações no colágeno e nas células epiteliais do endotélio vascular induzem à angiopatia que compromete a circulação sanguínea e conseqüentemente predispõe às ulcerações nos pés, artrite, gangrenas e amputações de membros (PEDROSA, 1997). Outros efeitos crônicos envolvem a neuropatia periférica caracterizada pela neuropatia autonômica que gera sintomas gastrintestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunções sexuais (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1993; UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP 38, 1998; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

A glicação de proteínas teciduais, de outras macromoléculas e a produção em excesso dos componentes da via do polioliol a partir da glicose estão correlacionados com os mecanismos de produção da lesão tecidual decorrente da hiperglicemia crônica, com o aumento dos produtos finais de glicação avançada, estresse oxidativo e os efeitos crônicos do DM (COOPER, 2004; AHMED, 2005). Com a elevação dos níveis glicêmicos há aumento de atividade desta via. A aldose redutase está presente na retina, papilas renais, cristalino, células de Schwann e aorta. O acúmulo de sorbitol nos tecidos, principalmente naqueles cuja entrada de glicose é independente da insulina, provoca entrada de água nas células, uma vez que é molécula osmoticamente ativa. Há inibição da Na^+/K^+ ATPase e diminuição de mioinositol. Observa-se então, diminuição da velocidade de condução nervosa seguida por

degeneração da mielina da fibra nervosa. Ainda, a frutose também se liga não enzimaticamente às proteínas, com os mesmos danos causados pela glicose. Têm sido sintetizados inibidores da aldose redutase, que, se administrados no início da neuropatia, induzem melhora sintomática e da função da fibra nervosa. Essa via é uma das possíveis explicações para o fato de pacientes com diabetes terem uma incidência aumentada de aterosclerose, doenças cardiovasculares, vasculares periféricas e cerebrovasculares. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

O aumento da glicação protéica ocorre em pacientes com DM e também nos modelos animais, sendo muito estudada em roedores. A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) é formada pela condensação da glicose com valina N-terminal de cada cadeia β da HbA formando uma base de Schiff (aldimina, pré- HbA_{1c}), que sofre um rearranjo para formar uma cetoamina estável. A HbA_1 e HbA_{1b} tem porções glicídicas unidas a outros aminoácidos. Para a HbA_{1a1} e HbA_{1a2} , as oses unidas são a frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato, respectivamente (BEM, 2006). A HbA_1 é a principal fração correspondendo a 80% da hemoglobina glicosilada total (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2004). A formação de hemoglobina glicada é irreversível e seu nível sanguíneo depende da vida da hemácia, aproximadamente 120 dias e da concentração de glicose no sangue. Deste modo, as medidas de hemoglobina glicada representam a “memória hiperglicêmica”, ou seja, uma avaliação da glicemia de seis a oito semanas anteriores ao exame em pacientes com hemácias normais. O exame de determinação do percentual de HBA1c em relação à HbA sem glicação não é utilizado para o diagnóstico de diabetes mellitus, mas é essencial para acompanhar a glicemia do paciente por absorver o impacto dos valores de glicemia de muitas semanas anteriores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2004).

A união da glicose com a albumina forma uma cetoamina resultante da ligação da glicose com o grupo amino da lisina da albumina (GROSS et al, 2002). O nome genérico dado a todas as proteínas séricas glicadas foi de frutosamina que é representada principalmente pela maior fração protéica do soro, a albumina. A meia-vida da albumina é de aproximadamente 20 dias, este parâmetro representa as flutuações dos níveis glicêmicos por um período de duas a três semanas e se eleva em pacientes com DM mal controlada e também em ratos diabéticos (DEVLIN, 2007; GROSS et al, 2002).

Para estudos de DM existem modelos animais que mimetizam os sintomas clínicos do diabetes mellitus em humanos. A maioria desses foi estabelecida utilizando-se roedores, entretanto, tem sido citado na literatura uma série de modelos envolvendo outras espécies de mamíferos inclusive primatas. O diabetes experimental quando induzido por drogas promove similaridade com diabetes tipo 1. Os modelos que envolvem animais geneticamente modificados podem representar os diversos tipos de diabetes aumentando as possibilidades de avaliação dos aspectos da doença (REES; ALCOLADO, 2005)

Diabetes pode ser facilmente induzida em animais através da administração de substâncias que são seletivamente tóxicas às ilhotas β pancreáticas. A mais comumente usada é a estreptozotocina, um antibiótico derivado de *Streptomyces acromogenes* (REES; ALCOLADO, 2005). A administração parenteral de uma dose única de estreptozotocina em ratos adultos resulta no diabetes insulino-dependente de início rápido com marcante hiperglicemia e sintomas clássicos do DM tipo1. A simplicidade deste modelo tornou-o mais comum para o estudo do diabetes e de suas complicações, incluindo a neuropatia (FEDERIUK et al, 2004). A administração intraperitoneal de doses de estreptozotocina em ratos recém-nascidos pode induzir DM tipo 2 com resistência à insulina característica (CUMAN; BERSANI-AMADO; FORTES, 2001). A aloxana é outra toxina usada na indução do diabetes, com mecanismo de ação similar à estreptozotocina e menos seletiva para as células beta pancreáticas (FEDERIUK et al, 2004). Um terceiro método de induzir diabetes consiste na administração de uma dieta rica em galactose (MIZISIN, A.P. et al, 2004).

Semelhante à condição clínica, os modelos induzidos de neuropatia diabética demonstram a redução do fluxo sanguíneo para o tecido nervoso periférico, condução nervosa lenta, acúmulo de metabólitos da via do poliol (SCHMID, 2007), redução do calibre das fibras nervosas e alteração do limiar de dor. Em geral a neuropatia é semelhante, embora não seja idêntica nos diferentes modelos de indução de diabetes. Isso pode ser exemplificado pela menor velocidade de condução nervosa induzida pela administração da estreptozotocina quando comparada com a aloxana. As diferenças entre a indução com estreptozotocina e galactose dizem respeito à condução nervosa, fluxo sanguíneo do tecido nervoso e calibre do axônio (APFEL, 2006).

Nos modelos animais as alterações morfológicas típicas da neuropatia são menos evidentes. Os ratos com diabetes induzida por estreptozotocina após um mês apresentam redução na velocidade de condução nervosa, com limiar de dor anormal e aumento dos níveis de polióis no nervo ciático. Não foram encontradas diferenças significativas na área fascicular, na mielinização das fibras e na densidade de regeneração de fibras mielínicas e amielínicas entre ratos diabéticos e não-diabéticos. Provavelmente as alterações morfológicas apareçam apenas em longo prazo (WALKER, D. et al., 1999).

No diabetes clínico, os pacientes convivem com a doença durante muitos anos até que apareçam as complicações características. Isso ocorre porque o nível de glicose pode ser controlado pela insulina e drogas hipoglicemiantes, mantendo assim um estado de saúde tão bom quanto possível. Nos modelos animais induzidos por drogas, a neuropatia deve ser avaliada dentro de poucas semanas ou meses, pois na ausência de um tratamento efetivo o estado de saúde dos animais fica comprometido devido ao crescimento reduzido, poliúria e diarreia. Após um tempo maior esses animais não são adequados para o estudo da neuropatia diabética (APFEL, 2006).

Dentre as diversas complicações clínicas do diabetes, destaca-se a neuropatia periférica. Essa manifestação traz uma perda substancial da qualidade de vida dos pacientes, pois os tratamentos disponíveis não se mostram eficazes em aliviar a dor (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006). Nesse contexto torna-se importante conhecer os mecanismos biológicos da dor neuropática e os métodos farmacológicos de intervenção, como base para a realização de estudos que visam descobrir novas abordagens terapêuticas.

As lesões neuropáticas causadas pelo diabetes podem afetar tanto a inervação autonômica quanto a inervação sensitiva somática. No primeiro caso, a doença normalmente progride envolvendo a inervação autonômica do coração, o que resulta no principal fator de mortalidade de pessoas diabéticas. Já o segundo caso, está relacionado à perda da sensibilidade mecânica dos membros, à sensibilidade dolorosa, ao aparecimento de ulcerações traumáticas e à necessidade de amputação. Os mecanismos desta doença ainda não foram totalmente elucidados (DOBRETSOV; ROMANOVSKY; STIMERS, 2007).

A dor neuropática é distinguida de outros tipos de condições dolorosas onde o fator gerador da dor começa com uma doença num tecido não neural. A dor não-

neuropática é dita nociceptiva e inclui condições tais como, osteoartrite e dor inflamatória. Por definição, a dor neuropática origina-se de uma lesão do sistema nervoso. Inúmeras doenças podem estar relacionadas: autoimunes (esclerose múltipla), metabólicas (neuropatia diabética), infecciosas (herpes zoster, neuralgia pós-herpes), vasculares (isquemia), trauma e câncer. Uma regra aparentemente sem exceção é que a lesão dolorosa deve envolver diretamente as vias nociceptivas. Por exemplo, lesões do lemnisco medial não induzem dor (CAMPBELL; RICHARD, 2006).

A neuropatia diabética afeta, sobretudo, a inervação periférica. O dano causado pelo diabetes depende do comprimento dos axônios afetados, isso explica porque o nervo isquiático é o mais lesado. Os pacientes relatam sentir formigamento nos pés e nas mãos. Testes quantitativos de percepção sensorial revelam a diminuição da sensibilidade dolorosa – que pode vir ou não acompanhada pela diminuição da sensibilidade ao toque (DYCK, PJ, *et al*, 2000).

É provável que o maior problema associado com a neuropatia periférica diabética (NPD) seja a variedade de manifestações clínicas desta doença, complicando sua classificação e tratamento. Na NPD, a neuropatia se instala frequentemente de maneira bilateral, com avanço da região distal para proximal e predominando manifestações sensitivas sobre as motoras; entretanto dois pacientes escolhidos ao acaso podem não ter nada em comum em seu histórico, sintomatologia e progressão etiológica (DOBRETSOV; ROMANOVSKY; STIMERS, 2007).

Existem duas categorias de distúrbios sensitivos relacionados à NPD, positivos e negativos. Os sintomas positivos incluem: dor, parestesia e uma sensibilidade exagerada (hiperalgesia – sensação de dor exagerada como resultado de exposição a um estímulo nocivo suave) que faz o paciente responder a estímulos leves e moderados (alodinia – percepção de dor em exposição de estímulo tátil inócuo). Os sintomas negativos consistem em perda de uma ou mais modalidades da percepção sensorial (DOBRETSOV; ROMANOVSKY; STIMERS, 2007; Woolf & Mannion, 1999; Bridges et al., 2001).

Dentre os neurônios sensitivos envolvidos na nocicepção temos as fibras A δ (dor rápida) - responsáveis pela dor aguda e pungente e bem localizada, as fibras C (dor lenta) - dor em queimação, difusamente localizada; de início lento e de longa duração. As fibras A δ são mielinizadas, insensíveis à capsaicina e respondem à presença de PGI $_2$ liberando na medula espinhal o neurotransmissor glutamato. As

fibras C podem ser divididas em dois tipos, ambas amielínicas e sensíveis à capsaicina: o primeiro responde à presença de ATP liberando na medula o neurotransmissor glutamato e o segundo responde à presença de bradicinina, substância P e histamina liberando substância P no corno posterior medular (UEDA, 1999; INOUE; UEDA, 2000; RENBACK et al., 2000; UEDA et al., 2001; TSUDA et al., 2002; INOUE et al., 2003a; RASHID et al., 2004a).

Do ponto de vista molecular, receptores vanilóides, opióides e de bradicinina, dentre outros, apresentam participação expressiva tanto nas vias de dor quanto nas vias de analgesia. Os receptores vanilóides são canais catiônicos não-seletivos que, quando estimulados, por exemplo, por capsaicina – substância presente na pimenta, do gênero *Capsicum* – iniciam uma excitação neuronal através do influxo de cátions. Dada a presença desses receptores, prioritariamente, em fibras polimodais C, esses receptores medeiam a exocitose de mediadores pró-inflamatórios, como a substância P. Tem sido demonstrado, também, que a dessensibilização de tais receptores exerce um papel crítico nas ações analgésicas dos vanilóides – o que pode estar relacionado à utilidade da capsaicina no alívio da dor (UEDA, 2006).

Os receptores opióides também exercem expressivo papel nas vias da analgesia. Contudo, a potência analgésica da morfina é intensamente diminuída em modelos de dor neuropática (OSSIPOV et al., 1995; IDANPAAN-HEIKKILA et al., 1997; RASHID et al., 2004a). Estudos recentes têm proposto muitos mecanismos associados a isso, tais como: expressão reduzida de receptores μ -opióides no corno dorsal da medula espinal, liberação intensificada de dinorfina A e colecistocinina, que contrapõem a analgesia por morfina, expressão aumentada de receptor metabotrópico de glutamato 1 e ativação das vias tônicas de facilitação descendente a partir do cérebro (PORRECA et al., 1998, NICHOLS et al., 1997, NICHOLS et al., 1996; ZHANG et al., 2000, FUNDYTUS et al., 2001, VANDERAH et al., 2001).

Quanto aos receptores de bradicinina, conhecem-se dois tipos: B1 e B2 – este último expresso constitutivamente, enquanto o primeiro se expressa após injúria tissular (STERANKA et al., 1988; PRADO et al., 2002). A bradicinina é um nonapeptídeo produzido pela clivagem de cininogênios por calicreínas, um dos mais potentes mediadores inflamatórios (BHOOLA et al., 1992). Uma troca fenotípica em que a expressão de receptores B2 é diminuída enquanto aumenta a expressão de

receptores B1 é descrita diante da lesão de nervos sensoriais, bem como em respostas nociceptivas induzidas por bradicinina (UEDA, 2006).

Outros peptídeos também participam da neurotransmissão e da neuromodulação em neurônios sensoriais primários. A relação de tais neuropeptídeos com a troca fenotípica envolvida nos mecanismos moleculares da neuropatia pode ser compreendida após axotomia periférica: os níveis de substância P, peptídeos relacionados ao gene da calcitonina e somatostatina são reduzidos, ao passo que se incrementam os níveis de peptídeo intestinal vasoativo, galanina, neuropeptídeo Y, colecistocinina, dentre outros (SHEHAB & ATKINSON, 1986; HOKFELT et al., 1987; NIELSCH et al., 1987; VILLAR et al., 1989; NOGUCHI et al., 1990; DUMOULIN et al., 1991). A depleção da substância P é um ponto fundamental na perda da transmissão nervosa através de fibras amielínicas tipo C (RASHID et al., 2003b) – embora, uma vez que a hiperalgesia se segue a uma injúria parcial do nervo ciático, sugere-se que essa perda de transmissão dolorosa seja superposta pela hipersensibilidade observada em fibras glutamatérgicas A δ (UEDA, 2006).

Na procura por novas abordagens terapêuticas para o tratamento da neuropatia diabética, uma alternativa bastante racional é buscar novos princípios ativos entre os componentes químicos da biodiversidade. Isso porque produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas usadas em clínica no mundo. Sendo que 25% desse total correspondem a princípios retirados das plantas superiores (GURIB-FAKIM, 2006).

As plantas sempre foram uma fonte indispensável de alimentos e medicamentos para o homem, e mesmo hoje continuam um meio promissor de obtenção de novas alternativas terapêuticas. Desde as últimas quatro décadas, observou-se um notável ressurgimento do interesse em estudar as plantas medicinais e é esse desejo global que motiva o isolamento e caracterização de novas moléculas químicas com atividade farmacológica. A atual tendência mundial de se utilizar medicamentos derivados de plantas criou a necessidade de informações mais precisas sobre propriedades, usos, eficácia, segurança e qualidade desses produtos (OJEWOLE, 2007).

A família Leguminosae Adams é composta pelas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae totalizando aproximadamente, 650 gêneros e 18.000

espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo (ZARUCHI, 1994; HEGNAUER; BARKMEIJER, 1993).

O gênero *Cenostigma* Tul. (Caesalpinioideae) é formado por quatro espécies denominadas *C. tocanthinum*, *C. gardnerianum*, *C. macrophyllum* e *C. sclerophyllum*, as quais apresentam hábitos arbóreos e arbustivos, distribuídas nas formações de mata, cerrado e caatinga das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (FREIRE, 1994; SOUSA et al., 2007).

A *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, maraximbé ou fava-do-campo e ocorre nos estados de Mato Grosso, Pará, Rondônia, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Ceará, Pernambuco, Bahia e Piauí (FREIRE, 1994). A beleza, decorrente das flores amarelas (figuras 1 e 2), a faz ser empregada como planta ornamental. Na cidade de Teresina, capital do Piauí foi escolhida, através de decreto municipal nº 2.407, de 13.08.93, como a árvore símbolo da cidade.

Em levantamento etnobotânico, realizado na região do semi-árido piauiense, consta que as cascas do caule, folhas e flores da *C. macrophyllum* são usadas popularmente para o tratamento de doenças estomacais e intestinais. Estudos com extrato e frações das folhas desta espécie revelaram a presença de atividades diversas, dentre as quais, antioxidante (SOUSA et al., 2007), inibidora de glicação protéica (PIAUILINO et al., 2008; REIS; MARANHÃO; BRITO, 2002), antiinflamatória, antinociceptiva, antibacteriana e antiulcerogênica (PEREIRA et al., 2006; SANTOS et al., 2000; ALMEIDA et al., 2002).

O estudo fitoquímico das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire, caneleiro (Caesalpinaceae, Leguminosae) possibilitou a obtenção de biflavonas e triterpenóides (SANTOS, 2001; COSTA, 2003; COSTA, 2005). A avaliação química da casca do caule levou ao isolamento e identificação da dilactona do ácido valoneico, ácido elágico, lupeol, ferulato de alquila, colesterol, campesterol, stigmasterol e sitosterol, mostrando uma predominância de esteróides e compostos relacionados a taninos. Outras espécies desta família são ricas em substâncias de outros grupos fitoquímicos, tais como, antraquinonas, polissacarídeos, lipídios, triterpenos, diterpenos, esteróides, taninos, além de flavonóides (SILVA et al., 2007).



Figura 1. *Cenostigma macrophyllum*
Carvalho, F. C. B de, 2009. Fotografia digital



Figura 2. Detalhe dos ramos com flores de
Cenostigma macrophyllum. Carvalho, F. C.
B de, 2009. Fotografia digital

Dados da literatura indicam que flavonóides de origem vegetal apresentam *in vitro*, efeitos inibitórios potentes da atividade da aldose redutase (AR) do cristalino do rato (EL-KABBANI et al., 1999; SARGES; PETERSON, 1986; FELICIO et al., 1995; MATSUDA et al., 1995). Trabalhos recentes apontam flavonóides como hipoglicemiantes (AHMAD et al., 2000), inibidores da glicação da hemoglobina (HbA1c) e antioxidantes (ASGARY et al., 1999). Flavonóides isolados de *Tilia argentea* e plantas ricas em flavonóides como *Cistus laurifolius* L. apresentaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva em estudos realizados com camundongos (TOKER, G. et al, 2004, KÜPELI, E; YESILADA, E, 2007).

A escolha da fração hidroalcolica (FHA) das folhas foi feita com base em dados anteriores obtidos em estudo químico que demonstrou o potencial desta fração para a obtenção de biflavonas (SANTOS, 2001; COSTA, 2003; COSTA, 2005). Dados preliminares obtidos com extrato etanólico das folhas (EEtOH) de *Cenostigma macrophyllum* apontaram para efeitos de redução da glicação protéica em ratos diabéticos (REIS; MARANHÃO; BRITO, 2002). Além disso, a FHA e FM22S (fração semi-purificada da FHA contendo a mistura de amentoflavona e agatisflavona (figuras 3 e 4) obtidas da partição do EEtOH das folhas) promoveu inibição da glicação da hemoglobina *in vitro* (PIAUILINO et al., 2008).

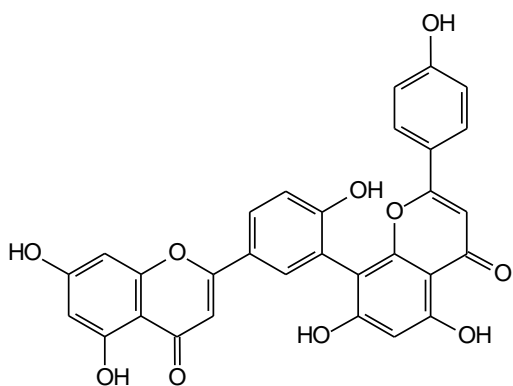


Figura 3. Agatisflavona

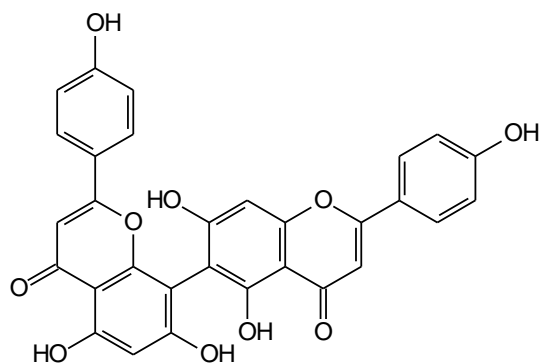


Figura 4. Amentoflavona

As biflavonas isoladas do extrato etanólico das folhas de *Ouratea spectabilis* denominadas de 6,6"-bigencuanina e 7,7"-dimetoxiagatisflavona promoveram a inibição da aldose redutase do cristalino em bovinos (FELICIO et al., 1995) o que aponta esta classe de compostos como promissores no controle das complicações crônicas do diabetes.

Considerando os efeitos de flavonóides no diabetes mellitus e nas complicações desta doença já demonstrados na literatura, nos propomos a avaliar a atividade da FHA e mistura de biflavonas obtidas de *Cenostigma macrophyllum* na neuropatia diabética.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antinociceptiva e antioxidante de frações ricas em flavonóides obtidas de *Cenostigma macrophyllum* em ratos diabéticos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o limiar nociceptivo mecânico semanal em ratos diabéticos tratados por 33 dias com fração hidroalcoólica (FHA) das folhas de *Cenostigma macrophyllum*;
- Avaliar o efeito antinociceptivo agudo da fração hidroalcoólica (FHA) das folhas e FM22S (fração semi-purificada da FHA das folhas contendo a mistura de biflavonas) em ratos diabéticos, com estimulação mecânica;
- Quantificar a glutatona reduzida (GSH) e a atividade da catalase hepáticas em camundongos submetidos à hepatotoxicidade por paracetamol e tratados com a FM22S;
- Avaliar o efeito da FHA das folhas de *Cenostigma macrophyllum* na glicação da hemoglobina;
- Avaliar o efeito da FHA sobre as alterações metabólicas desencadeadas pelo diabetes.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e obtenção do material vegetal:

As folhas de *Cenostigma macrophyllum* foram coletadas na sede do Sindicato dos Trabalhadores da Universidade Federal do Piauí (SINTUFPI), Teresina – PI, no mês de julho. As exsiccatas da planta (*Cenostigma macrophyllum*) já foram identificadas e armazenadas no Herbário Graziela Barroso da UFPI (exsicata 10.374).

As folhas da *Cenostigma macrophyllum* Tul, secas e moídas (4 Kg), foram extraídas com etanol 95 % em 5 etapas consecutivas a temperatura ambiente. O extrato etanólico concentrado, 547 g, foi suspenso em metanol/água (1:2) e extraído sucessivamente com acetato de etila rendendo a fase aquosa (F. H₂O) e acetato de etila (F. AcOEt). Esta última foi concentrada, suspensa em metanol/água (9:1) e extraída sucessivamente com hexano produzindo uma fase hexânica e uma hidroalcoólica (MeOH/H₂O).

A fase hidroalcoólica (20 g) foi submetida a um pré-tratamento cromatográfico em coluna de Amberlite XAD-2 (92 g) eluída sucessivamente com água destilada; água/metanol 50 %; metanol; hexano; acetona e acetato de etila, produzindo frações correspondentes a cada solvente

A fração MeOH (4,7 g) eluída da coluna de Amberlite XAD-2 com metanol, foi submetida a separação cromatográfica em coluna de gel de sílica (150 g) utilizando como eluentes CHCl₃/MeOH (98:2, 96:4, 90:10) e metanol. A coluna rendeu 36 frações de 250 mL cada, eluídas como segue: 1-15 (CHCl₃/MeOH 98:2), 16-21 (CHCl₃/MeOH 96:4), 22-28 (CHCl₃/MeOH 90:10) e 29-36 (MeOH 100%).

Após avaliação por cromatografia em camada delgada de gel de sílica utilizando como eluente CHCl₃/MeOH (90:10), as frações de FM15 – FM24 foram reunidas (1,13 g) e denominada de fração rica em biflavonas (FRB). As frações FM32 - FM36 foram reunidas (1,66 g), pois apresentaram-se constituídas de abundante material de elevada polaridade, sendo reservada para testes de atividades biológicas. Uma amostra da FRB foi analisada por RMN ¹H e ¹³C.

As subfrações FRB-10 (177 mg) e FRB-19 (260 mg) foram suspensas em MeOH gerando precipitados amarelos FRB-10a (88 mg) e FRB-19a (46 mg). Seus cromatogramas obtidos por CCD, usando como eluente CHCl_3 -MeOH (90:10) e como revelador solução de sulfato cérico, mostraram a presença de manchas amarelas persistentes. A análise por RMN ^1H e ^{13}C destas frações resultou na identificação da 7-metoxiamentoflavona (VI) e amentoflavona (V), respectivamente.

A subfração FRB-8 (78 mg) eluída com CHCl_3 -MeOH (95:5) e o sobrenadante de FRB-19 (204 mg) foram recromatografadas em coluna de Sephadex LH-20, eluídas isocraticamente com MeOH resultando nas subfrações FRB-8a (11 mg) e FRB-19b (150 mg), respectivamente. Estas frações, constituídas de sólidos amarelos, apresentaram também manchas amarelas persistentes, em seus cromatogramas obtidos por CCD, com CHCl_3 -MeOH (90:10) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador. A análise por RMN ^1H e ^{13}C resultou na identificação da 7''-metoxiamentoflavona (VII) e agatisflavona (IV) respectivamente.

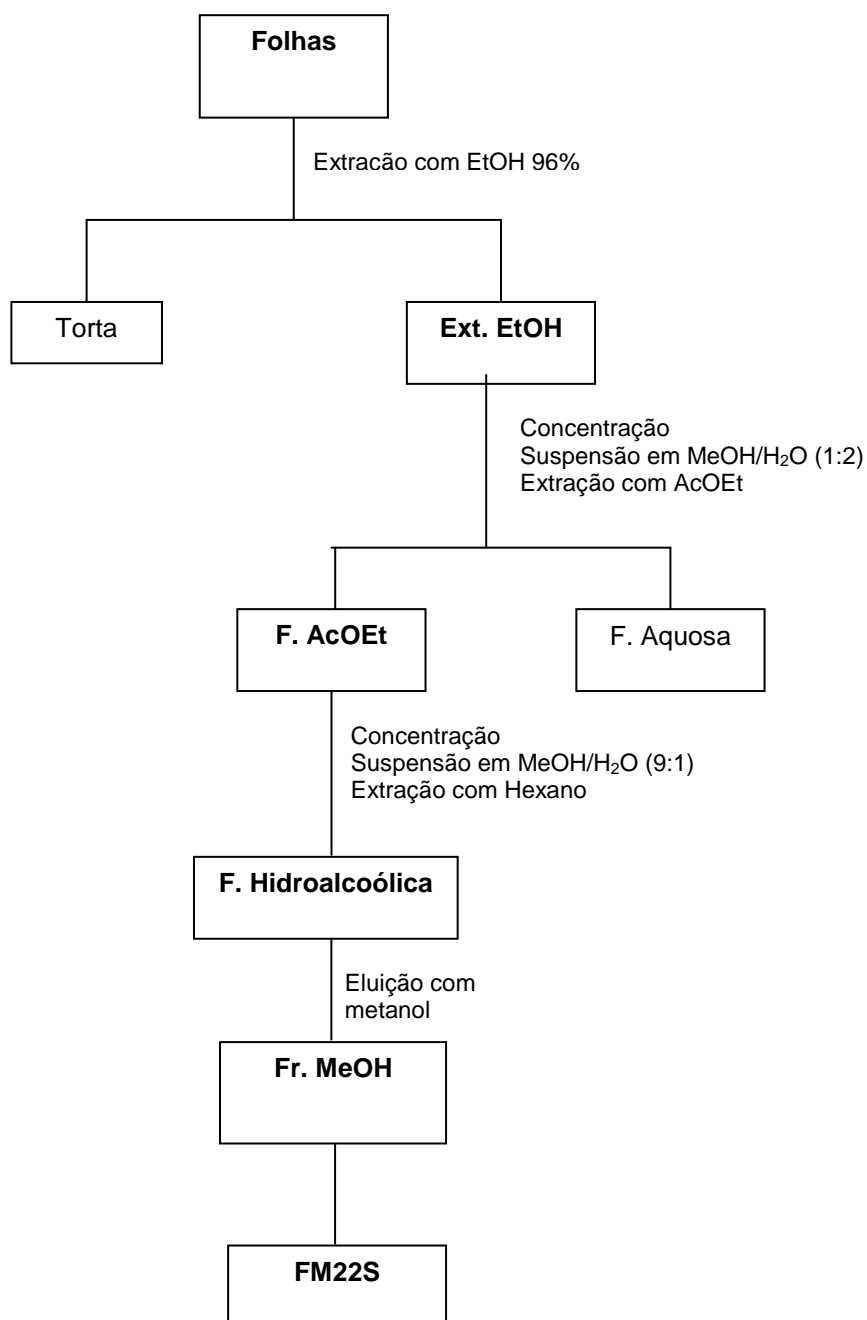


Figura 5. Esquema de fracionamento fitoquímico de *Cenostigma macrophyllum* (COSTA, 2005). .
 Ext. EtOH: Extrato etanólico; F. AcOEt: Fração Acetato de Etila; Fr. MeOH: Fração Metanólica e
 FM22S: Fração Rica em Biflavonas.

3.2 Tratamento crônico de ratos diabéticos com a fração hidroalcóolica (FHA) de *Cenostigma macrophyllum*

3.2.1 – Animais e Indução do diabetes mellitus (DM)

Foram utilizados ratos Wistar machos (220- 270 g) do biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais - UFPI. Os animais passaram por jejum de 12h água *ad libitum* e foram submetidos à indução do diabetes mellitus com sintomatologia tipo I, por injeção de estreptozotocina (STZ, 40mg/Kg de peso, i.v.), em tampão citrato 0,01M, pH 4,5 (PEPATO et al., 2001). A glicemia foi avaliada 48 h após a injeção de STZ, em estado de jejum de 12h. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram glicemia no estado de jejum igual ou superior a 270 mg/dL ou 15mM. Os animais diabéticos e controles (não diabéticos) foram utilizados os experimentos descritos no item 3.2.2.

3.2.2 – Avaliação dos efeitos da FHA em animais diabéticos

Após 48h da indução do diabetes conforme item 3.2.1, os ratos foram separados em três grupos contendo 12 a 15 animais: Controle (normais), Diabético-Veículo, e Diabético-Planta (FHA). No grupo Diabético-Veículo, foi administrado Veículo (NaCl 0,9%). Os animais do grupo Diabético - Planta foram tratados por 33 dias com FHA (125 mg/Kg, v.o). O limiar médio de resposta aos filamentos de von frey (em g) foi determinado semanalmente pela aplicação destes filamentos na superfície plantar da pata traseira dos animais (CHAPLAN et al, 1994; RAGHAVENDRA; RUTKOWSKI; DeLEO, 2002). Ao final do tratamento (completando 35 dias de experimento), os animais foram sacrificados após a colheita do sangue. Foram determinados a massa corpórea, os níveis séricos de glicemia, uréia, albumina, frutossamina, creatinina e a % de hemoglobina glicada (Kits de diagnósticos-LABTEST).

3.3. Tratamento agudo de ratos diabéticos com FHA e FM22S (fração semi-purificada da FHA das folhas - biflavonas).

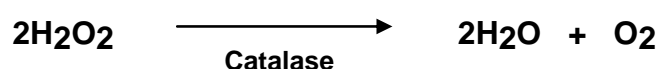
A indução de DM tipo 1 com STZ foi realizada conforme descrito no item 3.2.1. Os animais controles e diabéticos foram submetidos ao estímulo mecânico utilizando-se os filamentos de von Frey para detecção do limiar nociceptivo antes e 15, 30 e 35 dias após a indução do DM. A determinação do limiar de dor no período de 30 dias após a indução foi utilizada para selecionar os ratos neuropáticos que receberam o tratamento com dose única de FHA (500mg/Kg, v.o) ou FM22S (biflavonas- 60mg/Kg, v.o) ou morfina (5mg/Kg. i.p) no 35º dia, quando os animais foram submetidos ao estímulo mecânico com filamentos de von Frey nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora

Camundongos swiss (25-30 g) foram separados em seis grupos. Os grupos de animais foram tratados por três dias, sendo eles: Salina (NaCl 0,9% v.o), Veículo (NaCl 0,9% + Etanol 0,5% v.o), Salina-Paracetamol (NaCl 0,9% v.o), Veículo-Paracetamol (NaCl 0,9% + Etanol 0,5% v.o), NAC-Paracetamol (N-acetilcisteína 750mg/kg i.p) e FM22S-Paracetamol (mistura de biflavonas 50mg/Kg v.o + NaCl 0,9% + Etanol 0,5% v.o), Paracetamol (Salina v.o). No 3º dia, após duas horas do tratamento, foi administrado Paracetamol (350 mg/Kg v.o) aos grupos Salina-Paracetamol, Veículo-Paracetamol, NAC-Paracetamol e FM22S-Paracetamol. Após a aplicação do Paracetamol, os animais foram submetidos a um jejum de 24 h. Em seguida foi coletado sangue e os animais sacrificados para a retirada do fígado que foi homogeneizado em tampão específico para determinação da atividade da catalase e quantificação da glutathiona reduzida.

3.4.1 Atividade da catalase

A catalase catalisa a oxidação do peróxido de hidrogênio a H₂O e O₂.

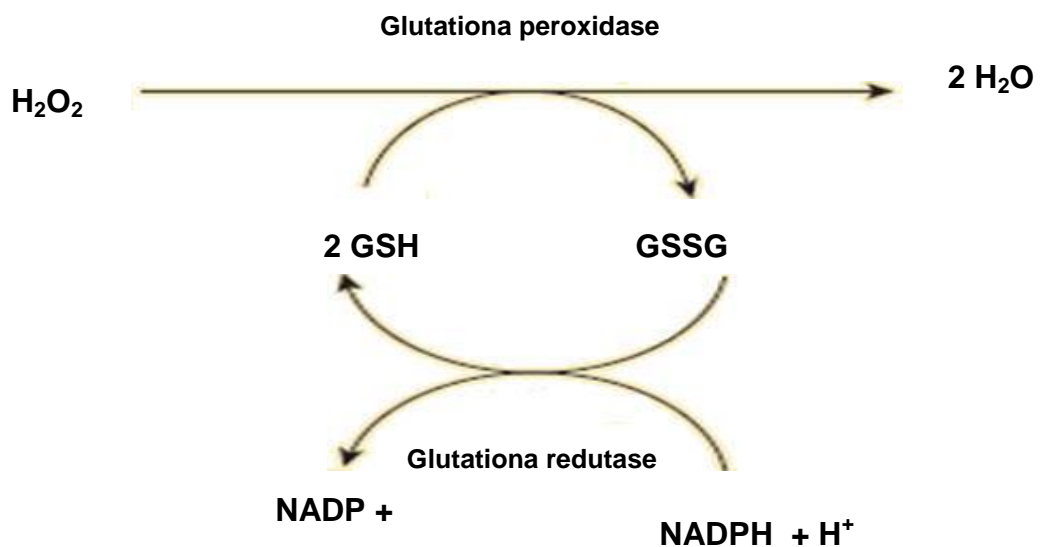


A metodologia empregada foi descrita por Ching (1975), quantificando a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima mediante o decréscimo da densidade ótica a 230 nm (coeficiente de extinção molar $0,0071 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) a 37°C . Os resultados foram expressos em U/mg de tecido.

A atividade da catalase foi avaliada no homogenato do tecido hepático preparado com 200 mg de tecido/ 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0. As amostras do homogenato foram centrifugadas a 5800 rpm por 10 min sob refrigeração (4°C). Os sobrenadantes foram diluídos 50 vezes com tampão Tris HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0, 10 μL desse foram submetidos a 2 ml do ensaio espectrofotométrico com tampão de ensaio Tris HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0 contendo H_2O_2 . A redução da absorbância do H_2O_2 foi acompanhada no espectrofotômetro durante 6 minutos a 230 nm e a atividade da enzima calculada com base no coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio (BEERS; SIZER, 1951).

3.4.2 Determinação da Glutathiona Reduzida

A Glutathiona Reduzida (GSH) participa da redução da Glutathiona oxidada através da oxidação do NADPH, conforme esquema abaixo:



O fígado foi homogeneizado com EDTA (500 mg de tecido/5 ml de EDTA 0,02M). A 4 mL do homogenato foram adicionados 3,2 mL de água destilada e 0,8 mL de TCA (ácido tricloroacético) 50%, sendo essa mistura centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos. Removeram-se 2mL do sobrenadante e a esse adicionou-se 4mL de Tris 0,4M EDTA 0,2M pH 8,9 e 0,1 mL de DTNB 0,01M. Fez-se a leitura em 412 nm no tempo de 5 minutos (FRANZONI et al.,2004).

3.5 Análise estatística

As médias com o erro padrão foram avaliados pelo Teste t de Student e ANOVA One-way (teste Tukey) significância: $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da Fração Hidroalcoólica (FHA) das folhas de *Cenostigma macrophyllum* em animais diabéticos.

4.1.1 Glicemia, massa corporal, uréia, creatinina, frutossamina, albumina e hemoglobina glicada (HbA1c) de ratos diabéticos tratados com a FHA (125mg/Kg v.o) por 33 dias.

Na tabela 1 são apresentadas as glicemias dos animais controles, diabéticos tratados com veículo ou com FHA 125 mg/Kg, v.o. Os dados demonstram que 48 horas após a indução com estreptozotocina (40 mg/Kg, i.v), os animais dos grupos Diabético-Veículo e Diabético-FHA estavam com a glicemia capilar acima de 15 mM ou 270 mg/dL, caracterizando o estado diabético. Os resultados mostram que ao término do período experimental, o tratamento com a FHA não promoveu controle da hiperglicemia.

Tabela 1 - Glicemia de jejum de ratos controles e diabéticos antes e após o tratamento com FHA 125 mg/Kg,v.o das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média \pm erro padrão, * p <0,05 vs Controle (Teste t de Student).

GRUPOS	Glicemia capilar 48h após a indução (mg/dL)	Glicemia sérica após 33 dias (mg/dL)
Controle (n= 15)	123,6 \pm 4,8	144,4 \pm 5,5
Diabético-Veículo (n= 12)	321,8* \pm 10,7	473,5* \pm 5,5
Diabético-FHA (n= 14)	341,7* \pm 8,4	449,6* \pm 5,2

Na Tabela 2 os dados mostram que não houve crescimento ponderal nos ratos diabéticos durante os 35 dias do período experimental, enquanto que no grupo controle (não diabético) houve ganho de massa significativo.

Tabela 2 – Massa corporal (g) de ratos controles e diabéticos antes e após o tratamento com Veículo (NaCl 0,9%) ou FHA 125 mg/Kg, v.o das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média \pm erro padrão, a ($p < 0,05$ vs Peso inicial) , b ($p < 0,05$ vs controle) (Teste t de Student).

GRUPOS	Peso corpóreo inicial (g)	Peso corpóreo após 33 dias (g)	Ganho de Peso durante o tratamento
Controle (n=15)	234 \pm 8,7	287 ^a \pm 8,9	52,9 \pm 7,4
Diabético -Veículo (n=12)	244,1 ^b \pm 6,4	245,5 ^b \pm 5,2	NS
Diabético-FHA (n=14)	248,6 ^b \pm 7,7	246,7 ^b \pm 8,4	NS

Nas Tabelas 3, 4, e 5. pode-se observar os resultados das dosagens séricas de uréia, creatinina e albumina, respectivamente. Os grupos diabético-veículo e diabético-FHA apresentaram níveis séricos da uréia significativamente maiores que os do controle. O discreto aumento da creatinina ocorreu nos grupos diabético-veículo e diabético-FHA e não foi acompanhado por alterações da albumina.

Tabela 3 - Uréia sérica de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA 125 mg/Kg, v.o das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média \pm erro padrão, ^a $p < 0,05$ vs Controle (Teste t de Student).

GRUPOS	URÉIA (mg/dL)
Controle (n=15)	50,9 ± 2,6
Diabético-Veículo (n=12)	86,3 ± 5,5 ^a
Diabético-FHA (n=13)	85,8 ± 7,4 ^a

Tabela 4 - Creatinina sérica de ratos machos normais, diabéticos tratados com veículo ou FHA 125 mg/Kg, v.o das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média ± erro padrão, ^a p <0,05 vs Controle (Teste t de Student).

GRUPOS	Creatinina (mg/dL)
Controle (n=12)	0,52 ± 0,03
Diabético-Veículo (n=11)	0,69 ± 0,04 ^a
Diabético-FHA (n=9)	0,67 ± 0,08 ^a

Tabela 5 - Albumina sérica de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo (solução fisiológica NaCl 0,9%) ou FHA 125 mg/Kg das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média ± erro padrão (Teste t de Student).

GRUPOS	ALBUMINA (g/dL)
Controle (n=15)	2,25 ± 0,12
Diabético-Veículo (n=12)	2,19 ± 0,09
Diabético-FHA (n=13)	2,10 ± 0,09

A glicação da hemoglobina *in vivo* foi inibida em 16,1% em ratos diabéticos tratados com a FHA das folhas de *Cenostigma macrophyllum* em relação aos animais que receberam o veículo, conforme a Tabela 6 e Figura 7. A frutossamina que representa a glicação de proteínas plasmáticas (principalmente a albumina) também foi reduzida em 31,4% pelo tratamento prolongado com FHA em relação ao grupo D-Veículo, atingindo valores similares aos animais controles (normais), conforme Tabela 6 e Figura 7.

Tabela 6 – Frutossamina sérica e % Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) de ratos normais, diabéticos tratados com Veículo ou FHA 125 mg/Kg, v.o das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média ± erro padrão, ^a p <0,05 vs Controle, ^b p <0,05 vs D-Veículo (Teste t de Student).

GRUPOS	HbA _{1c} (% da Hb total)	Frutossamina (mmol/L)
Controle	4,05 ± 0,44 n=15	165,7 ± 15,6 n=12
Diabético- Veículo	8,21 ± 0,40 ^a n=12	292,8 ± 18,7 ^a n=12
Diabético-FHA	6,89 ± 0,18 ^{a,b} n=13	200,8 ± 20,8 ^b n=11

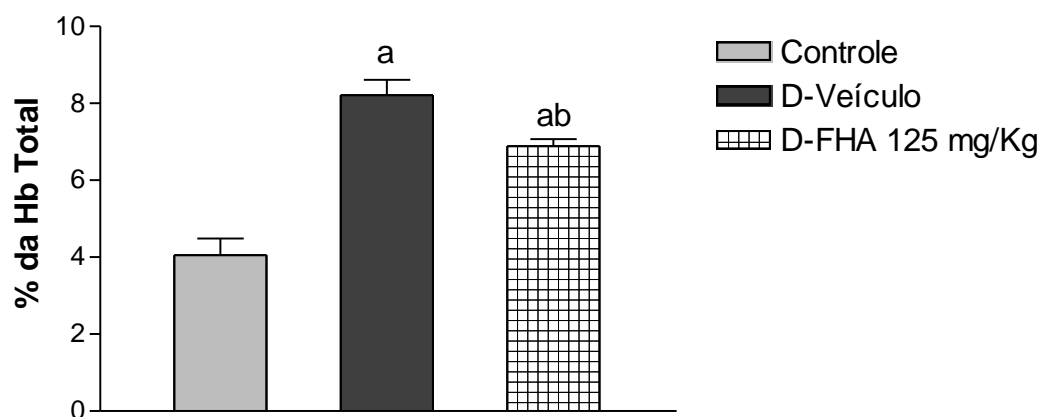


Figura 6. Percentual da Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) de ratos machos normais (Controle), diabéticos tratados com Veículo (D-Veículo) ou FHA 125 mg/Kg v.o(D-FHA), das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média \pm erro padrão, ^a $p < 0,05$ vs Controle, ^b $p < 0,05$ vs D-Veículo (Teste t de Student).

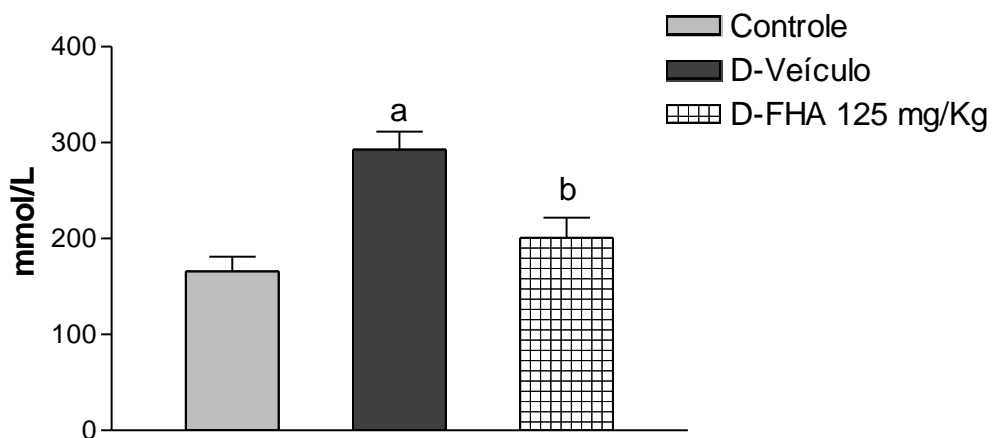


Figura 7. Frutosamina sérica de ratos machos normais (Controle), diabéticos tratados com Veículo (NaCl 0,9%) (D-Veículo) e diabéticos tratados FHA 125 mg/Kg v.o (D-FHA), das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 33 dias. Os dados expressam a média \pm erro padrão, ^a $p < 0,05$ vs Controle, ^b $p < 0,05$ vs D-Veículo (Teste t de Student).

4.1.2. Avaliação da neuropatia diabética e determinação do limiar nociceptivo mecânico

A redução do limiar nociceptivo mecânico foi observada nos ratos diabéticos que receberam somente o veículo na terceira semana após a indução do diabetes. O grupo diabético-FHA quando comparado ao grupo diabético-veículo apresentou maior limiar de sensibilidade à dor. Além disso, os ratos diabéticos tratados com a FHA apresentaram valores de limiar nociceptivo semelhantes aos ratos controles não diabéticos, como mostra a Figura 8. No grupo Diabético-veículo, os limiares determinados na terceira, quarta e quinta semanas foram significativamente menores do que aqueles avaliados na primeira e segunda semanas com estabilização antes do final de todo período experimental (35 dias, o tratamento iniciou 48h após a indução e prosseguiu por 33 dias).

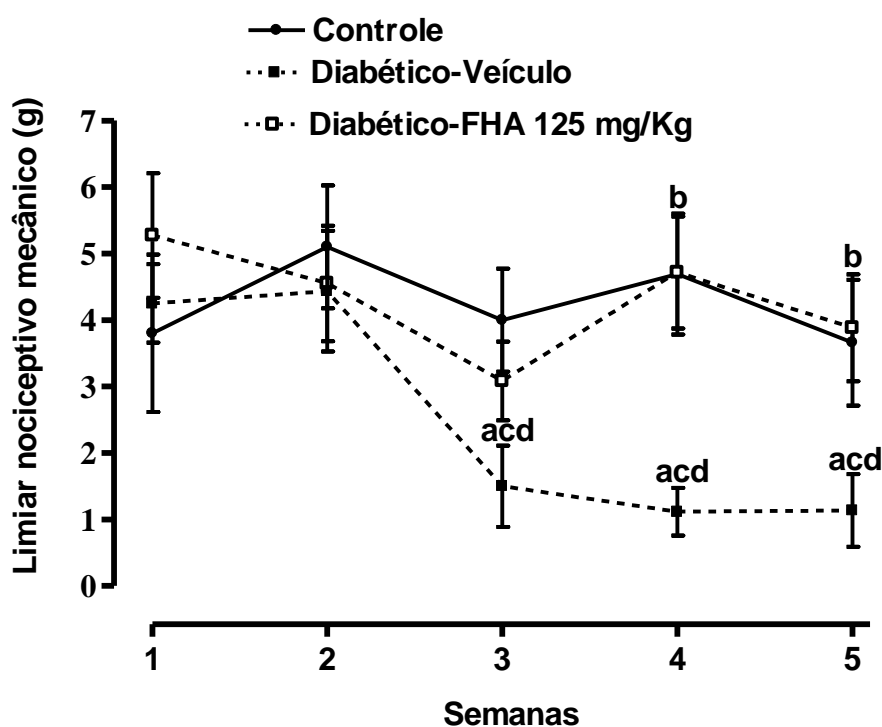


Figura 8. Limiar nociceptivo mecânico de ratos controles e diabéticos tratados com Veículo (NaCl 0,9%) ou FHA por 33 dias. n=11-15, ^a p<0,05 vs Controle; ^b p<0,05 vs Diabético-Veículo; ^c p<0,05 vs 1^a. semana ^d p<0,05 vs 2^a. semana (ANOVA One Way /Tukey).

4.2 Avaliação do efeito antinociceptivo agudo da Fração Hidroalcoólica das folhas (FHA) 500 mg/Kg de *Cenostigma macrophyllum* em animais diabéticos

Na tabela 7 são apresentados os níveis de glicemia capilar dos animais controles e diabéticos após 48 horas da indução com Estreptozotocina 40 mg/Kg (STZ).

Tabela 7 – Glicemia sérica de ratos não-diabéticos (controles) e diabéticos após 48 horas da indução do Diabetes e após 35 dias da indução. Os dados expressam a média \pm erro padrão, *p <0,05 vs Controle (Teste t de Student não-pareado).

GRUPOS	GLICEMIA INICIAL (mg/dL) APÓS 48 h	GLICEMIA FINAL (mg/dL) APÓS 35 DIAS
Controle (n=9)	115,6 \pm 5,0	156,5 \pm 8,3
Diabético (n=10)	497,6* \pm 13,2	497,8 \pm 9,4*

4.2.1. Efeito antinociceptivo agudo da FHA após 35 dias da indução do diabetes.

Foi realizada a determinação do limiar nociceptivo mecânico e avaliação da neuropatia diabética após a indução do DM. Os animais diabéticos apresentaram menor limiar nociceptivo diante do estímulo por compressão mecânica a partir da 2ª quinzena da indução de diabetes conforme a figura 9. Os ratos diabéticos com limiar menor do que 2g no período de 30 dias após a indução foram selecionados para avaliação do efeito antinociceptivo da FHA que foi realizada no 35^o dia.

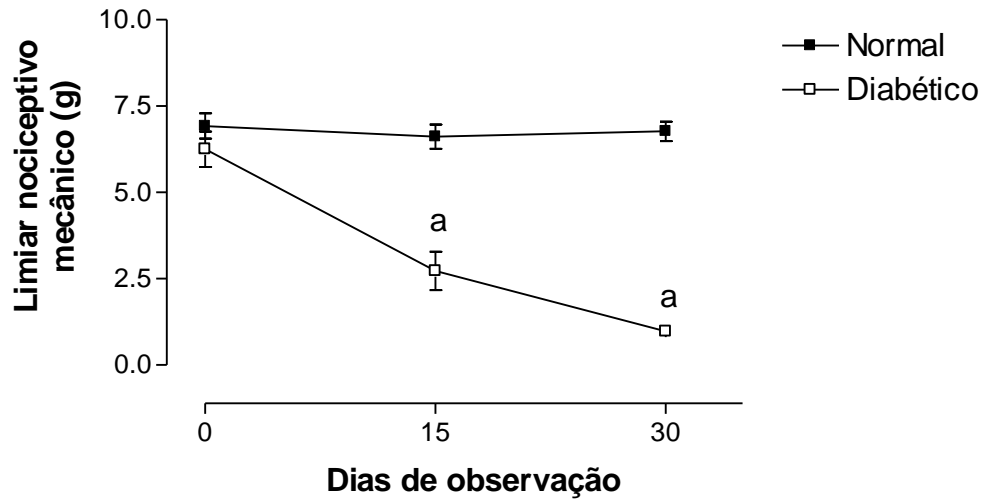


Figura 9. Limiar nociceptivo mecânico (g) quinzenal de ratos controles e diabéticos N=6-16, ^a p<0,05 vs Controle (ANOVA One Way/ Tukey).

Observou-se um aumento no limiar nociceptivo mecânico dos animais dos grupos D-FHA e D-Morfina em relação ao dos animais do grupo D-Veículo no tempo de 60 e 120 minutos após a administração de tais substâncias. Esse efeito manteve-se no tempo de 180 minutos para os animais do grupo morfina, conforme apresentado na figura 10. No grupo D-FHA observou-se um aumento no limiar nociceptivo nos tempos de 60 e 120 minutos quando comparado ao tempo 0.

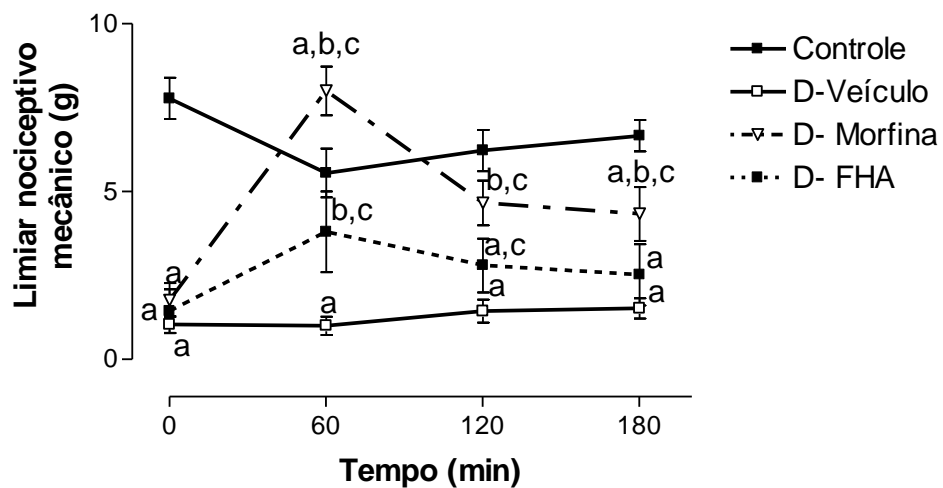


Figura 10. Limiar nociceptivo mecânico (g) de ratos diabéticos tratados com dose única de Morfina (5 mg/Kg, i.p.) ou FHA-folhas (500 mg/Kg, v.o) no 35º dia da instalação do diabetes, n=5-9, ^a p<0,05 vs Controle, ^b p<0,05 vs Diabético-Veículo, ^c p<0,05 vs tempo zero (ANOVA One Way/ Tukey).

4.3 Avaliação do efeito antinociceptivo agudo da FM22S 60 mg/Kg das folhas de *Cenostigma macrophyllum* em animais diabéticos.

Os dados da tabela 8 mostram os níveis séricos glicêmicos dos ratos controles e diabéticos nos tempos de 48 h e 35 dias após a indução do diabetes com STZ.

Tabela 8 – Glicemia sérica de ratos não-diabéticos (controles) e diabéticos após 48 horas da indução do Diabetes e após 35 dias da indução. Os dados expressam a média \pm erro padrão, * $p < 0,05$ vs Controle (Teste t de Student não pareado).

GRUPOS	GLICEMIA INICIAL (mg/dL)	GLICEMIA FINAL (mg/dL)
Controle	109,44 \pm 5,14 n=12	139,88 \pm 8,36 n=12
Diabético	377,98 \pm 10,84* n=12	410,62 \pm 16,49* n=12

4.3.1. Determinação do limiar nociceptivo mecânico em ratos diabéticos tratados com morfina ou FM22S

De forma semelhante aos dados obtidos anteriormente no item 4.2.2 e Figura 10, os ratos diabéticos apresentaram menor limiar nociceptivo diante do estímulo por compressão mecânica a partir da 2^a quinzena da indução de diabetes (Figura 11) e aqueles considerados neuropáticos foram submetidos à dose única de morfina ou FM22S (mistura de biflavonas). A figura 12 mostra o aumento do limiar nociceptivo mecânico no grupo D-FM22S em relação ao D-Veículo nos tempos de 60 minutos e de 120 minutos após a administração da FM22S. A elevação observada no grupo D-morfina se manteve durante as 3 horas de observação.

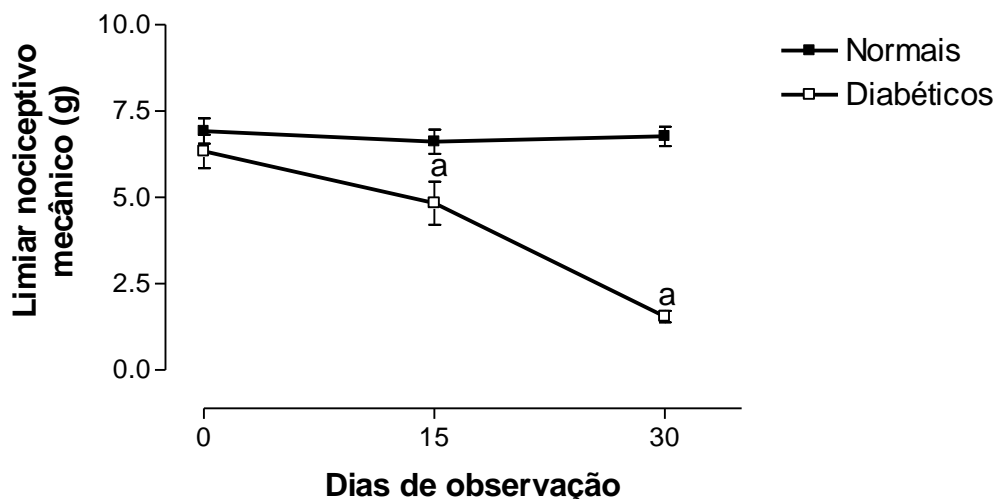


Figura 11. Limiar nociceptivo mecânico (g) quinzenal de ratos controles e diabéticos n=6-13, $p < 0,05$ vs Controle (ANOVA One Way/ Tukey).

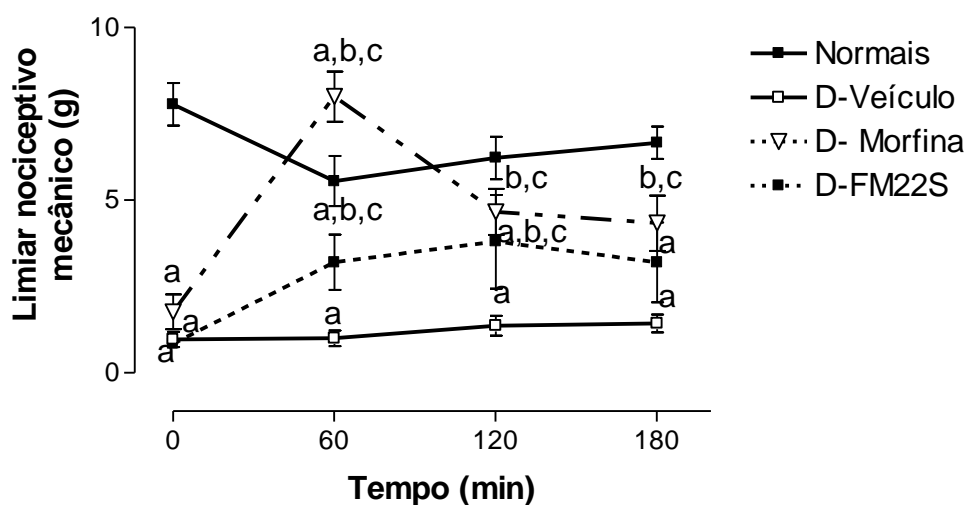


Figura 12. Limiar nociceptivo mecânico (g) de grupos diabéticos tratados com dose única de Morfina (5 mg/Kg, i.p.) ou FM22S (60 mg/Kg, v.o) no 35º dia da instalação do diabetes, sendo observados os limiares de início e após 60, 120 e 180 min do tratamento. n=5-9, ^a $p < 0,05$ vs Controle, ^b $p < 0,05$ vs Diabético-Veículo, ^c $p < 0,05$ vs tempo zero (ANOVA One Way/Tukey).

4.4 Avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora da mistura de biflavonas (50 mg/Kg) das folhas de *Cenostigma macrophyllum* em *Mus musculus*

4.4.1. Relação entre os grupos de animais e as mortes ocorridas

Os dados apresentados na tabela 9 mostram que houve mortes em todos os grupos tratados com o paracetamol. O grupo veículo-paracetamol apresentou um maior percentual de mortes do que os demais grupos. O grupo biflavonas-paracetamol apresentou um percentual alto em relação ao grupo controle positivo, mas demonstrou uma redução em relação ao grupo veículo-paracetamol.

Tabela 9. Número de mortes em relação ao número de animais e porcentagem de animais mortos nos grupos salina, veículo, salina-paracetamol, veículo-paracetamol, NAC-paracetamol e biflavonas-paracetamol após os três dias de tratamento e a administração do paracetamol 350 mg/Kg. v.o no último dia.

GRUPOS	Nº DE MORTES/ Nº DE ANIMAIS	% DAS MORTES
Salina	0/10	0
Veículo	0/10	0
Salina-Paracetamol	2/11	18
Veículo-Paracetamol	5/11	46
NAC-Paracetamol	5/18	28
Biflavonas-Paracetamol	6/19	32

4.4.2. Atividade da Catalase e quantificação da Glutathiona reduzida (GSH) no fígado

A atividade da catalase dos animais do grupo Biflavonas-Paracetamol foi aumentada em 57,8% ao grupo veículo-paracetamol, conforme Figura 13.

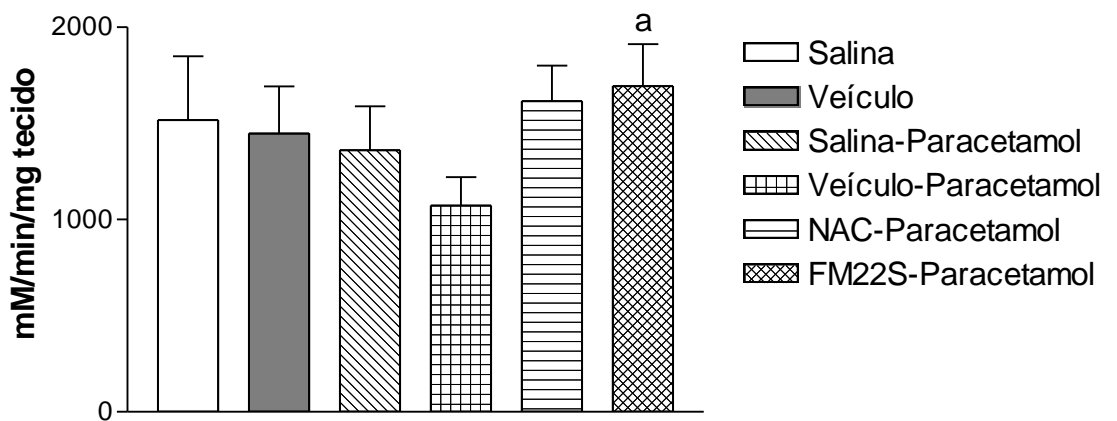


Figura 13: Níveis de catalase em animais controles e tratados com N-Acetilcisteína (NAC) 750mg/kg i.p e Biflavonas 50 mg/Kg das folhas de *Cenostigma macrophyllum* durante 3 dias e com Paracetamol 350 mg/Kg v.o no último dia. n=7-10, a p<0,05 vs Veículo-Paracetamol (Teste t de Student).

Não houve diferenças nos níveis de GSH (Glutathiona Reduzida) entre os grupos de animais, como mostrado na Figura 14.

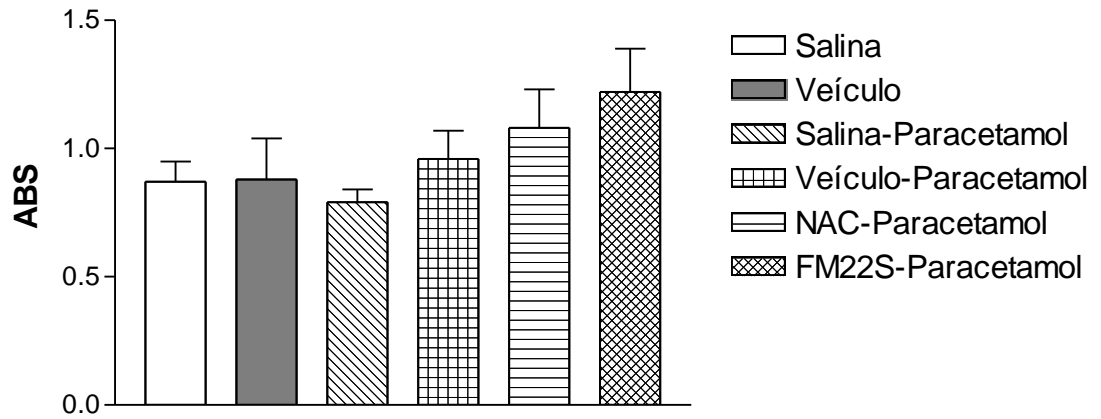


Figura 14: Níveis de GSH em animais controles e tratados com N- Acetilcisteína (NAC) 750mg/kg i.p e Biflavonas 50 mg/Kg das folhas de *Cenostigma macrophyllum* durante 3 dias e com Paracetamol 350 mg/Kg v.o no último dia. n=6-13 $p>0,05$ (Teste t de Student).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Os ratos com diabetes induzido com STZ 40mg/Kg apresentaram um quadro típico de *Diabetes mellitus tipo I*. A destruição das células beta do pâncreas pela STZ mimetizou o estado diabético dependente de insulina, que se caracterizou por um quadro hiperglicêmico e sem ganho significativo de peso corpóreo, confirmando dados da literatura (PEPATO et al., 2001; REES; ALCOLADO, 2005; APFEL, 2006).

Os valores mais elevados da glicemia no grupo diabético podem ser explicados pela insuficiência insulínica que ocasiona uma diminuição da síntese e translocação dos transportadores de glicose, responsáveis pela captação de glicose nos tecidos insulino-dependentes (SCHMITZ-PEIFFER, 2000), ativação da glicogenólise hepática, proteólise muscular e gliconeogênese (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2004).

Os ratos com diabetes induzido com STZ apresentaram quadro típico de *Diabetes mellitus tipo I*. A destruição das células beta do pâncreas pela STZ mimetizou o estado diabético dependente de insulina, que se caracterizou por um quadro hiperglicêmico, com perda de peso corpóreo, polidipsia e com aumento de uréia sérica.

A baixa relação insulina/glucagon induziu ao aumento da uréia sérica conforme previsto, devido à inibição da glicólise e concomitante ativação das enzimas chaves da gliconeogênese hepática (DEVLIN, 2007; NELSON; COX, 2002; BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2004). A maior velocidade da gliconeogênese induziu ao elevado consumo de aminoácidos de proteólise com sobrecarga de nitrogênio para a síntese da uréia (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2004).

Neste trabalho, não foi observado efeito hipoglicêmico da fração hidroalcoólica (FHA) das folhas de *Cenostigma macrophyllum* nos ratos tratados por 33 dias após a indução do diabetes. A falta de controle na glicemia e a alta produção de uréia nos grupos tratados sugerem que a FHA não influencia a secreção de insulina. Entretanto, os animais diabéticos tratados com a FHA por 33 dias apresentaram redução de 16,1% da hemoglobina glicada quando comparados com animais diabéticos tratados com veículo. A HBA1c é um excelente índice de avaliação da glicação de proteínas em ratos e também em pacientes diabéticos. O aumento de 50,6% na glicação da hemoglobina no grupo DM tratados somente com veículo corroboram dados já descritos por Trejo-Gonzfilez, et al. (1996) que demonstram o

aumento da glicação da hemoglobina em ratos diabéticos. Reis, Maranhão e Brito (2002) demonstraram que ratos diabéticos apresentaram aumento da glicação protéica após 15 dias da indução de DM com estreptozotocina (STZ). A redução da HBA1c no grupo DM tratado com a FHA é consistente com os resultados anteriores obtidos por Reis, Maranhão e Brito (2002) que indicavam um menor percentual de glicação da hemoglobina em ratos com DM tratados com o EEtOH das folhas de *Cenostigma macrophyllum* por 15 dias. Entretanto, a inibição da glicação protéica foi parcial, não sendo atingidos os percentuais observados nos ratos controles (normais).

A frutossamina elevou-se drasticamente nos ratos diabéticos (43,4%) após 35 dias da indução da doença, conforme o esperado. No entanto, o tratamento com a fração hidroalcoólica (FHA) da planta por 33 dias inibiu a formação de frutossamina em 31,4%. Como as proteínas do soro se renovam mais rapidamente do que a hemoglobina, este parâmetro representa as flutuações dos níveis glicêmicos por um período de duas a três semanas e eleva-se nos ratos e em pacientes com DM mal controlada, conforme já mostrado anteriormente (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2004; GROSS; NEHME, 2001). O discreto aumento da creatinina sérica observada no grupo diabético-veículo pode sinalizar o início das complicações tardias do diabetes, como a nefropatia. Entretanto, os animais deste grupo apresentaram níveis normais de albumina sérica após 33 dias de tratamento do diabetes, o que valida os resultados obtidos nas dosagens de frutossamina.

As medidas de hemoglobina glicada representam a “memória hiperglicêmica” por um período mais longo do que a frutossamina devido à meia-vida da hemácia. O exame de determinação do percentual de HBA1c em relação à HbA sem glicação é essencial para acompanhar a glicemia do paciente por absorver o impacto dos valores de glicemia de muitas semanas anteriores, mas também é o indicativo do nível de glicação protéica nos tecidos insulino-independentes, lipoproteínas séricas como LDL (lipoproteína de baixa densidade) e colágeno (AHMED, 2005). O aumento dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), do estresse oxidativo e da formação de produtos finais de lipoperoxidação avançada (ALEs) em animais e pacientes com DM tem estreita correlação com os efeitos crônicos da doença (AHMED, 2005; LAPOLLA; TRALDI; FEDELE, 2005). O estudo realizado pelo Diabetes Control and Complications Trial (1993) descreveu os percentuais de riscos para vários efeitos crônicos do DM tipo 2 correlacionados com o percentual de

hemoglobina glicada (HBA1c), como também determinou o percentual de redução dos riscos, considerando a redução de 1% da HBA1c de pacientes com DM tipo 2 (UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP, 1998; Sociedade Brasileira de Diabetes,2004).

De acordo com os resultados da glicemia, a FHA não apresentou efeitos hipoglicemiantes, isto indica que os efeitos observados na inibição da glicação protéica sejam devidos ao possível efeito antioxidante da FHA. As reações de glicação protéica com posterior arranjo de Amadori são de oxidação. Além disso, a glicose pode se auto-oxidar na presença de metal de transição para formar um radical enediol que induz a formação do ânion superóxido a partir do oxigênio molecular, ou ser reduzida a sorbitol pela aldose redutase gerando glioxal e metilglioxal que são também considerados AGEs. Substâncias antioxidantes são descritas como inibidoras de glicação protéica, tais como, a vitamina E ou tocoferol, glutathiona reduzida (GSH) e flavonóides como quercetina, rutina e camferol (AHMED, 2005; SENA et al.2008; JAIN,1998; BAE; LEE, 2004; ASGARY et al., 1999; PIAUILINO et al., 2008). Neste contexto, a FHA que apresenta riqueza de biflavonas e a fração semi-purificada desta contendo amentoflavona e agatisflavona apresentaram efeitos inibitórios da glicação *in vitro* da hemoglobina diante de alta concentração de glicose no meio de incubação (PIAUILINO et al., 2008). Esses achados reforçam a idéia de que os efeitos observados *in vivo* são devidos à atividade antioxidante das biflavonas e não do controle glicêmico dos ratos diabéticos. Por outro lado, os flavonóides são também descritos como inibidores da aldose redutase que reduz a glicose a sorbitol, sendo importantes inibidores da via dos polióis e dos efeitos crônicos do DM (FELICIO et al., 1995). As biflavonas 6,6"-bigencuanina e 7,7"-dimetoxi-agatisflavona isoladas do EEtOH das folhas de *Ouratea spectabilis* promoveram a inibição da aldose redutase do cristalino em bovinos (FELICIO et al., 1995). Deste modo, a riqueza de biflavonas nas folhas de *Cenostigma macrophyllum* e a inibição da glicação *in vitro* da hemoglobina pela FHA e pela FM22S (fração semi-purificada obtida da FHA) corroboram os dados obtidos *in vivo* em ratos diabéticos e sugerem que o efeito observado *in vivo* pode ser devido às biflavonas.

A fração FM22S obtida a partir da FHA de *Cenostigma macrophyllum* e que contem as biflavonas amentoflavona e agatisflavona promoveu aumento da atividade da catalase hepática em camundongos submetidos à administração de paracetamol

em relação aos animais que receberam paracetamol e foram tratados somente com o veículo. Como o veículo de dissolução das biflavonas contém etanol que pode influenciar na hepatotoxicidade do paracetamol de forma positiva ou negativa dependendo se o período observado é de curto ou longo prazo (DEVLIN, 2007), foi feita a comparação dos grupos tratados com salina 0,9% - sem paracetamol com o veículo-paracetamol e este com o grupo salina 0,9%-paracetamol para compreensão dos possíveis efeitos do etanol. A presença do etanol no grupo veículo-paracetamol não induziu alterações na atividade da catalase dosada em condições otimizadas. Os grupos que não receberam paracetamol, mas salina ou veículo não apresentaram alterações na atividade da enzima, indicando que o etanol 0,5% não influenciou na concentração da enzima. O maior percentual de mortes no grupo veículo-paracetamol em relação ao salina-paracetamol e a todos os demais grupos avaliados é sugestivo de efeitos hepatóxicos adicionais do etanol. A dose de N-acetil-cisteína (NAC) empregada não promoveu melhorias na atividade da catalase nem na concentração de glutathiona reduzida (GSH) diante da hepatotoxicidade do paracetamol. Além disso, a NAC não evitou a perda de animais por mortes, pois o percentual de mortes do grupo tratado com NAC foi maior do que no grupo salina-paracetamol. A maior atividade da catalase em animais tratados com a mistura de biflavonas indicativa de proteção antioxidante não foi acompanhada pelo aumento de GSH, mas por percentual de mortes menor do que aquele detectado no grupo veículo-paracetamol.

Os efeitos protetores da mistura de biflavonas são sugestivos de proteção contra efeitos crônicos do DM. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da FHA e da mistura de biflavonas (FM22S) obtidas das folhas de *Cenostigma macrophyllum* na neuropatia diabética caracterizada por maior sensibilidade à dor (hiperalgesia e alodinia). O quadro de neuropatia diabética observado pelas medidas do limiar de dor induzido por estímulo mecânico ao longo do período de tratamento dos animais foi instalado entre a segunda e terceira semana após indução do diabetes. A partir da terceira semana, a redução do limiar de dor nos ratos diabéticos não tratados foi mais drástica e estabilizou-se ao longo dos 35 dias de DM. Esses resultados são concordantes com os descritos na literatura, que relatam a manifestação da hiperalgesia mecânica em animais com redução de 20 a 40% do limiar de dor, sendo um dos mais consistentes sinais da neuropatia periférica em modelos de DM em animais (DOBRETISOV, et al., 2003). A hipersensibilidade ao estímulo mecânico foi

relatada por alguns autores como sendo detectável após uma semana da indução de DM (CHEN; PAN.,1998; FOX., et al., 1999) e completamente desenvolvida entre 2 e 8 semanas de DM, sendo influenciada por efeitos diretos e indiretos da hiperglicemia (CHEN; PAN.,1998; Fox., et al., 1999; COURTEIX; ESCHALIER;LAVARENNE,1993; COURTEIX, et al., 1996; SASAKI, et al., 1998; ZHANG; SONG; LAMOTTE, 1999).

Devido à heterogeneidade da polineuropatia humana, é razoável que os modelos de DM induzidos em roedores apresentem diferenças na neuropatia instalada. Nesse sentido, os modelos com STZ demonstram reduções na velocidade de condução nervosa, no fluxo sanguíneo, no calibre das fibras nervosas e no limiar de dor, como também tem sido observado acúmulo de metabólitos da via dos polióis (APFEL, 2006).

Os ratos com DM que receberam tratamento crônico com a FHA das folhas de *Cenostigma macrophyllum*, apresentaram limiar de dor semelhantes àqueles determinados nos animais não diabéticos durante o período experimental (5 semanas). Estes dados são indicativos de efeitos protetores da FHA contra o desenvolvimento da neuropatia diabética dolorosa em ratos, que podem estar correlacionados com a atividade antioxidante e inibição da formação de produtos finais de glicação avançada. Por outro lado, é possível que a FHA apresente atividade antinociceptiva quando avaliada em modelos de dor neuropática. Neste sentido, as respostas de ratos- STZ neuropáticos à dose única da FHA e da FM22S (mistura de biflavonas) são de redução da nocicepção após 60 minutos da administração da FHA e por 2h da FM22S. Esses resultados não excluem os possíveis efeitos protetores da FHA na NPD, visto que promoveu inibição da glicação protéica *in vivo* e *in vitro* possivelmente mediado pela mistura de biflavonas.

Os ratos neuropáticos tratados com morfina apresentaram aumento de limiar nociceptivo por todo o período de detecção (3 horas). Em geral, acredita-se que os estados de dor neuropática humana são resistentes aos opióides, entretanto, existem dados mostrando efeito analgésico de altas doses de opióides em modelos animais de dor neuropática, provavelmente devido a algumas ações adicionais, como o antagonismo de receptores de glutamato tipo NMDA (HWANG; WILCOX,1987) e inibição da recaptação de aminas biogênicas (DWORKIN, 2003) .

A patogênese do DM induzido com STZ envolve a perda sensorial correlacionada com a retração das células do gânglio da raiz dorsal, edema axonal da

raiz neural e encurtamento dos axônios de neurônios periféricos, induzidos pelo estresse oxidativo e atividade apoptótica com possível envolvimento do receptor de neurotrofina p75 (JIANG; JAKOBSEN, 2004).

A NPD é uma das mais comuns complicações do DM, cuja etiologia não foi ainda bem esclarecida e existem limitações para o tratamento de seus sintomas. Uma possível alternativa corresponde ao uso de antioxidantes, a eficácia dessas substâncias na correção da NPD em animais e humanos suportam a hipótese de que a hiperglicemia aumenta as espécies reativas de oxigênio (ROS) que sobrecarregam os mecanismos antioxidantes das células e levam ao desenvolvimento de estresse oxidativo/nitroativo e condições pró-inflamatórias nos tecidos. As alterações na produção de óxido nítrico no endotélio dos vasos sanguíneos epi- e endoneurais resultam em distúrbios da circulação e hipóxia endoneurais que ampliam e aceleram os efeitos da hiperglicemia nas células gliais e em neurônios. Os danos às células gliais levam à desmielinização e menor velocidade de condução nervosa (DOBRETSOV et al, 2003).

A hiperglicemia não consiste no único fator desencadeador de NPD, pois os estudos da patogênese de NPD sugerem que seja multifatorial. No que diz respeito à sinalização da insulina, os receptores de insulina (IR) são também expressos no sistema nervoso central e periférico. Enquanto que no fígado, músculos esqueléticos e adipócitos há abundantemente expressão dos receptores do tipo IR-B, no sistema nervoso a maioria é do tipo IR-A com afinidade semelhante ao IR-B. É possível que a correção dos níveis de insulina plasmática em tratamentos de DM tipo 1 ou terapia sensibilizante em DM tipo 2 não apenas controle a glicemia, mas tenha efeitos no sistema nervoso periférico o que pode explicar o desenvolvimento de NDP em pacientes pré-diabéticos (FRASCA et al., 1999). Estudos do Diabetes Control and Complications Trial demonstram que a neuropatia é menos prevalente em pacientes que se mantiveram em intensiva terapia insulínica (MARTIN et al., 2006). Além disso, a administração intratecal de insulina em ratos-STZ hiperglicêmicos resultou na correção da velocidade de condução nervosa motora e sensorial sem alterações efetivas na hiperglicemia (BRUSSEE; CUNNINGHAM; ZOCHODNE, 2004). Segundo, Dobretsov, Romanovsky e Stimers (2007), a redução no limiar de dor por compressão é proporcional ao grau de insulinopenia, sendo de notável aspecto o fato da terapia

com insulina melhorar a condução nervosa e aumentar o limiar de dor sem concomitante controle da hiperglicemia.

Estudos demonstram que o IR no sistema nervoso central (SNC) está envolvido no controle pela insulina do comportamento alimentar, funções reprodutivas e cognitivas e neuromodulação (SUGIMOTO; MURAKAWA; SIMA, 2000;FREYCHET, 2000). Já estão descritos os efeitos neurotróficos da insulina, estimulando a regeneração de nervos periféricos. Entretanto, em longo prazo os efeitos da insulina na NDP são suprimidos. Para curtos prazos de DM, a insulina é importante para regular a relação axônio-glia, permeabilidade capilar, fluxo sanguíneo endoneurial e função dos neurônios aferentes primários nociceptivos (SUGIMOTO et al., 2000;SUGIMOTO; MURAKAWA; SIMA, 2002;KIHARA, 1994) A insulina regula diretamente os potenciais de membrana mitocondriais, afeta a fosforilação oxidativa, suprime a expressão da NADPH oxidase, controla a expressão do NF-kB com efeitos anti-inflamatórios, regulação da Na, K-ATPase e produção de NO endotelial. Neste contexto, a insulinopenia tem potencial para promover efeitos neuropáticos, tais como, os previamente atribuídos somente à hiperglicemia (DANDONA et al, 2005;NEDREBO et al, 2004;DAVEL; ROSSONI; VASSALLO, 2000; SWEENEY, 1998; STEINBERG, 1994).

Outros fatores têm sido relatados como significantes no estudo da NDP. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF I e IGF II), que apresentam funções neurotróficas ativando a expressão de genes, codificam as proteínas do citoesqueleto axonal e controlam a sobrevivência e regeneração neuronal. O peptídeo C também apresenta efeitos neurotróficos por aumentar a autofosforilação do IR e reverter a expressão reduzida dos receptores de IGF I, NGF e neurotrofina-3 em ratos com DM espontânea (DOBRETSOV; ROMANOVSKY, STIMERS, 2007).

A complexidade dos múltiplos fatores da neuropatia diabética dificulta a compreensão de seus mecanismos e aplicação de alternativas terapêuticas para a prevenção e tratamento. A busca de antinociceptivos, inibidores de glicação protéica e antioxidantes, pode levar ao desenvolvimento de medicamentos para retardar a progressão dos efeitos crônicos do DM e/ou tratamento da doença, contribuindo para melhoria da qualidade e da expectativa de vida dos pacientes.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os animais utilizados (ratos Wistar machos) apresentaram-se diabéticos segundo os parâmetros avaliados e com limiar nociceptivo mecânico reduzido. Os dados sugerem que a fração hidroacoólica (FHA) obtida das folhas de *Cenostigma macrophyllum* apresenta efeito inibidor da glicação protéica, efeito protetor no desenvolvimento da neuropatia dolorosa e efeito antinociceptivo no tratamento agudo. A fração semi-purificada FM22S apresentou efeitos antioxidantes e antinociceptivo.

Referências

7. REFERÊNCIAS

AHMAD, M., AKHTAR, M.S., MALIK, T., GILANI, A.H. Hypoglycaemic action of the flavonoid fraction of *Cuminum nigrum* seeds. *Phytother Res*, Mar, vol. 14(2), pp. 103-106, 2000.

AHMED, N. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications, *Diabetes Research and Clinical Practice* 67, pp 3–21 Review, 2005.

ALMEIDA, F. R. C., FONTAO, D. F. S., OLIVEIRA, R. C. M., CRUZ, F. J. S. M., NUNES, P. H. M. Atividade anti-ulcerogênica em extrato aquoso e etanólico das cascas de *Cenostigma macrophyllum* tul. Var. *Acuminata*. In: reunião anual da fesbe, 2002, salvador/ba. Livro de resumos da xvii reunião anual da fesbe, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care*, volume 31, supplement 1, january 2008.

APFEL, S. C. Diabetic neuropathy models: Are they relevant? *Drug Discovery Today: Disease Models*. Vol. 3, No. 4, 2006

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(5), p. 223-226, 1999.

BAE, J. W., LEE, M. H. Effect and putative mechanism of action of ginseng on the formation of glycated hemoglobin in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 91, p. 137–140, 2004.

BEERS, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.*, v. 195, p. 133-140, 1951.

BEM, A. F. de, KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes *mellitus*. J. Bras. Patol. Med. Lab. V. 42(3), p.185-191, 2006.

BERG, J. M., STRYER, L., TYMOCZKO, J. L., Bioquímica. 5. ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BRIDGES, D., THOMPSON, S. W., RICE, A. S. (2001). Mechanisms of neuropathic pain. Br J Anaesth. v. 87(1), p. 12– 26, 2001.

BRUNO, R.; GROSS, J.L. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6 year follow-up study. J Diabetes Complications. Em impressão 2000.

BRUSSEE, V.; CUNNINGHAM, F. A.; ZOCHODNE, D. W. Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. Diabetes. v. 53. p. 1824-1830, 2004.

CAMPBELL, J. N., RICHARD, A. M. Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*. v. 52(1). p. 77–92, 2006.

CHAPLAN, S.R.; BACH, F.H.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. J. Neurosci. Methods. 1994, 53:55-63.

CHEN, S.R., PAN, H.L. Hypersensitivity of spinothalamic tract neuroglitazone on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetics associated with diabetic neuropathic pain in rats, J. Neurophysiology, v. 87, p. 2726–2733, 1998.

CHING J. C.; BEUTLER, E.. Purification and characterization of human erythrocyte pyridoxine kinase Clinica Chimica Acta, v. 61, n. 3(20), p. 353-365, 1975.

COOPER, M. E. Importance of Advanced Glycation End Products in Diabetes-Associated Cardiovascular and Renal Disease. *AJH*–December–VOL. 17, NO. 12, Part 2. pp 31S-38S, 2004.

COSTA, A. F. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2003.

COSTA, C. L. S. da. Constituintes químicos e atividades antibacteriana, antiulcerogênica e hepatoprotetora da *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae-Caesalpinioideae) Charlyton Luis Sena da Costa. – Teresina, 2005.

COURTEIX C., ESCHALIER, A., LAVARENNE , J. Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain, *Pain*, v. 53 p. 81–88, 1993.

COURTEIX, C., BARDIN, M., MASSOL, J., FIALIP, J., LAVARENNE, J., ESCHALIER, A. Daily insulin treatment relieves long-term hyperalgesia in streptozocin diabetic rats, *Neuroreport* , v. 7, p.1922–1924,1996.

CUMAN, R. K. N., BERSANI-AMADO, C. A., FORTES, Z. B. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflamm. Res.* vol.50, p. 460-465, 2001.

DANDONA, P.; MOHANTY, P.; CHAUDHURI, A.; GARG, R.; ALJADA, A. Insulin infusion in acute illness. *J Clin Invest.* v. 115. p. 2069-2072, 2005.

DAVEL, A. P.; ROSSONI, L. V.; VASSALLO, D. V. Effects of ouabain on the pressor response to phenylephrine and on the sodium pump activity in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*; v.406. p. 419-427, 2000.

DEVLIN, T. M. Manual de bioquímica com correlações clínicas, 6^a. ed., São Paulo, Ed. Blucher, 2007.

DOBRETISOV, M., ROMANOVSKY, D., STIMERS, J. R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. *World J Gastroenterol.* v. 14; 13(2), p. 175-191, 2007.

DUMOULIN, F. L., RAIVICH, G., STREIT, W. J., & KREUTZBERG, G. W. Differential regulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in regenerating rat facial nucleus and dorsal root ganglion. *Eur J Neurosci.* v. 3(4), p. 338– 342, 1991.

DWORKIN, R.H., BENNETT, G.J., LOESER, J.D., WATKINS, L.R. Advances in neuropathic pain: Diagnosis, mechanisms and treatment recommendations. *Arch. Neurol.* v. 60, p., 1524-1534, 2003.

DYCK, PJ, *et al.* Patterns of quantitative sensation testing of hypoesthesia and hyperalgesia are predictive of diabetic polyneuropathy: a study of three cohorts. Nerve growth factor study group. *Diabetes Care*, v. 23, p.510–517, 2000.

EL-KABBANI, O., OLD, S.E., GINELL, S.L., CARPER, D.A. Aldose and aldehyde reductases: structure-function studies on the coenzyme and inhibitor-binding sites. *Mol. Vis.*, v. 3, p. 5-20, 1999.

FEDERIUK, I. F. *et al.* Induction of Type 1 diabetes mellitus in laboratory rats by use of alloxan: Route of administration, pitfalls, and insulin treatment. *Comp. Med.* v.54, p. 252–257, 2004.

FELICIO, J.D., GONÇALEZ, E., BRAGGIO, M.M., COSTATINO, L., ALBASINI, A., LINS, A.P. Inhibition of lens aldose reductase by biflavones from *Ouratea spectabilis*. *Planta Med.*, Jun, v.. 61 (3), p. 17-20, 1995.

FOX, A., EASTWOOD, C., GENTRY, C., MANNING, D., URBAN, L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuro- treatment prevents the diabetogenic action of streptozotocin in rats, neuropathy in the rat. *Pain*, v. 81 p. 307– 316, 1999.

FRANZONI, F., PLANTINGA, Y., FEMIA, F. R., BARTOLOMUCCI, F. GAUDIO, C., REGOLI, F. CARPI, A., SANTORO, G., GALETTA, F. Plasma antioxidant activity and

cutaneous microvascular endothelial function in athletes and sedentary controls. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p.432–436, 2004.

FRASCA, F.; *et al.* Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* v. 19. p.3278-3288, 1999

FREIRE, F. M. T. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pernambuco, 1994

FREYCHET, P. Insulin receptors and insulin actions in the nervous system. *Diabetes Metab Res Rev.* v. 16. p. 390-392, 2000.

FUNDYTUS, M. E., YASHPAL, K., CHABOT, J. G., OSBORNE, M. G., LEFEBVRE, C. D., DRAY, A., *et al.* Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. *Br J Pharmacol.* v. 132(1), p.354– 367, 2001.

GROSS, J. L., SILVEIRO, S. P., CAMARGO, J. L. *et al.* *Diabetes Melito*: Diagnóstico, Classificação e Avaliação de Controle glicêmico. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*; v.46 (1), p. 16-26, 2002.

GROSS, J.L, NEHME, M. Detecção e tratamento das complicações crônicas do diabetes melito: Consenso da Sociedade Brasileira de Diabetes e Conselho Brasileiro de Oftalmologia, *Rev Ass Med Brasil*; v. 45(3). P. 279-84, 1999.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p 1–93, 2006

HEGNAUER, R., BARKMEIJER, R.J.G.Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the leguminosae: A chemotaxonomic approach. *Phytochemistry*, V. 34 (1) 3, p. 3-16, 1993

HOKFELT, T., WIESENFELD-HALLIN, Z., VILLAR, M., & MELANDER, T. Increase of galanin-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglion cells after peripheral axotomy. *Neurosci Lett.* v. 83(3), p. 217– 220, 1987.

HWANG, A.S., WILCOX, G.L. Analgesic properties of intrathecally administered heterocyclic antidepressants. *Pain*, v. 28 (3), p. 343-355, 1987.

IDANPAAN-HEIKKILA, J. J., GUILBAUD, G., & KAYSER, V. Prevention of tolerance to the antinociceptive effects of systemic morphine by a selective cholecystokinin-B receptor antagonist in a rat model of peripheral neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 282(3), p. 1366–1372, 1997.

INOUE, M., & UEDA, H. Protein kinase C-mediated acute tolerance to peripheral mu-opioid analgesia in the bradykinin-nociception test in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 293(2), p. 662–669, 2000.

INOUE, M., KAWASHIMA, T., ALLEN, R. G., & UEDA, H. Nocistatin and prepro-nociceptin/orphanin FQ 160-187 cause nociception through activation of Gi/o in capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 306(1), p. 141– 146, 2003a.

JAIN, S. K. Glutathione and Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency can increase protein glycosylation. *Free Radical Biology and Medicine.* v. 24, p. 197-201(5), 1998.

JIANG, Y., JAKOBSEN, J. The role of the p75 neurotrophin receptor in the morphology of dorsal root ganglion cells in streptozotocin diabetic mice: effects of sciatic nerve crush. *Diabetologia*, v. 47, p. 502-1510, 2004.

KIHARA, M.; ZOLLMAN, P. J.; SMITHSON, I. L.; LAGERLUND, T. D.; LOW, P. A. Hypoxic effect of exogenous insulin on normal and diabetic peripheral nerve. *Am J Physiol.* v. 266. p. E980-E985, 1994.

KÜPELI, E; YESILADA, E. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures. Journal of Ethnopharmacology. v. 112, p. 524–530, 2007.

LAPOLLA, A., TRALDI, P. & FEDELE, D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. Clinical Biochemistry, v. 38, p. 103-115, 2005.

MALERBI D., FRANCO, L. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. Diabetes Care 1992;15:1509-16.

MARTIN, C. L.; ALBERS, J.; HERMAN, W. H.; CLEARY, P.; WABERSKI, B.; GREENE, D. A.; STEVENS, M. J.; FELDMAN, E. L. Neuropathy among the diabetes control and complications trial cohort 8 years after trial completion. Diabetes Care. v. 29. p. 340-344, 2006.

MATSUDA H., CAI H., KURO, M., TOSA, H., INUMA, M. Study on anti-cataract drugs from natural sources. II. Effects of buddlejae flos on in vitro aldose reductase activity. Biol. and Pharmac. Bull., v. 18 (3), p.463-466, 1995.

MIZISIN, A.P. *et al.* Ciliary neurotrophic factor improves nerve conduction and ameliorates regeneration deficits in diabetic rats. Diabetes, v. 53, p.1807–1812, 2004.

NEDREBO, T.; KARLSEN, T. V.; SALVESEN, G. S.; REED, R. K. A novel function of insulin in rat dermis. J Physiol. v. 559. p. 583-591, 2004.

NELSON, D. L. , COX, M. M. Lehninger - Princípios de Bioquímica. 4^a ed, Ed. Sarvier, São Paulo, 2006.

NICHOLS, M. L., BIAN, D., OSSIPOV, M. H., MALAN, Jr. T. P., & PORRECA, F. Antiallodynic effects of a CCKB antagonist in rats with nerve ligation injury: role of endogenous enkephalins. Neurosci Lett. v. 215(3), p. 161–164, 1996.

NICHOLS, M. L., LOPEZ, Y., OSSIPOV, M. H., BIAN, D., & PORRECA, F. Enhancement of the antiallodynic and antinociceptive efficacy of spinal morphine by antisera to dynorphin A (1– 13) or MK-801 in a nerve-ligation model of peripheral neuropathy. *Pain*. v. 69(3), p. 317– 322, 1997.

NIELSCH, U., BISBY, M. A., & KEEN, P. Effect of cutting or crushing the rat sciatic nerve on synthesis of substance P by isolated L5 dorsal root ganglia. *Neuropeptides* 10(2), 137–145, 1987.

NOGUCHI, K., SENBA, E., MORITA, Y., SATO, M., & TOHYAMA, M. Alpha-CGRP and beta-CGRP mRNAs are differentially regulated in the rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Brain Res Mol Brain Res*. v. 7(4), p. 299–304, 1990.

OJEWOLE, J. A. O. Analgesic, anti-inflammatory and hypoglycaemic effects of *Rhus chirindensis* (Baker F.) [Anacardiaceae] stem-bark aqueous extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* , v. 113, p. 338–345, 2007.

OSSIPOV, M. H., LOPEZ, Y., NICHOLS, M. L., BIAN, D., & PORRECA, F. Inhibition by spinal morphine of the tail-flick response is attenuated in rats with nerve ligation injury. *Neurosci Lett*. v. 199(2), p.83–86, 1995.

PEPATO, M.T., FOLGADO, V.B., KETTELHUT, I.C., BRUNETTI, I.L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. *Braz. Med. Biol. Res*. v. 34(3). p. 389-95, 2001

PEREIRA, S. S., ALMEIDA, F. R. C., CHAVES, M.H., SILVA, L. L., SILVA, A. M. O., ALENCAR, N. L. Estudo dos Efeitos antiinflamatório e analgésico da casca de *Cenostigma macrophyllum* TUL. var. *acuminata* Teles Freire. In: XIV Seminário de Iniciação Científica da UFPI, 2006, Teresina. Anais da XIV Seminário de Iniciação Científica da UFPI. Teresina : EDUFPI, 2006.

PIAUILINO, C. A.; CARVALHO, F. C. B., PASSOS, F. F. B., SILVA, L. L., SILVA, H.

R., COSTA, C. L. S. CHAVES, M. H. ALMEIDA, F.R. C., BRITO, S. R. C. Inibição da glicação in vitro da hemoglobina III Regional da FESBE, Fortaleza-CE,2008.

PORRECA, F., TANG, Q. B., BIAN, D., RIEDL, M., ELDE, R., & LAI, J. Spinal opioid mu receptor expression in lumbar spinal cord of rats following nerve injury. *Brain Res.* v. 795(1– 2), p. 197–203, 1998.

RAGHAVENDRA, V., RUTKOWSKI, M.D., DeLEO, J.A. The role of spinal neuroimmune activation in morphine tolerance/hyperalgesia in neuropathic and sham-operated rats. *J Neurosci.* v. 22, p. 9980-9. 2002.

RASHID, M. H., INOUE, M., KONDO, S., KAWASHIMA, T., BAKOSHI, S., & UEDA, H. Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicininsensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 304(3), p. 940–948, 2003b.

RASHID, M. H., INOUE, M., MATSUMOTO, M., & UEDA, H. Switching of bradykinin-mediated nociception following partial sciatic nerve injury in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 308(3), p. 1158– 1164, 2004a.

REES, D.A., ALCOLADO, J.C. Animal models of diabetes mellitus. *Diab. Med.* 22, 359–370, 2005.

REIS, J.C., MARANHÃO, SKS., BRITO, S. R. C. Avaliação da atividade de *Cenostigma macrophyllum* Tul. na glicemia e na glicosilação de hemoglobina em ratos diabéticos . In: XI Seminário de Iniciação Científica da UFPI., 2002, Teresina, 2002.

RENBACK, K., INOUE, M., YOSHIDA, A., NYBERG, F., & UEDA, H. Vzg-1/lysophosphatidic acid-receptor involved in peripheral pain transmission. *Brain Res Mol Brain Res.* v. 75(2), p. 350– 354, 2000.

ROMÃO JÚNIOR, J. E. Doença Renal Crônica: Definição, Epidemiologia e Classificação J. Bras. Nefrol. Volume XXVI, nº 3, Supl. 1, 2004.

SANTOS, F. J. B. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Piauí, Brasil, 2001;

SANTOS, F. J. B., COSTA, C. L. S., COSTA, A. F., COUTINHO, L. S., SKEFF, A. T. S., OLIVEIRA, E. H., CHAVES, M. H. Atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *Cenostigma* (Caesalpiniaceae). In: XVI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2000, Recife. Livro de Resumos, 2000.

SARGES, R., PETERSON, M.J. Sorbinil: A member of the novel class of spirohydantoin aldose reductase inhibitors. *Metabolism*, v. 35 (4), pp.101-104, 1986.

SASAKI, T., YASUDA, H., MAEDA, K., KIKKAWA, R. Hyperalgesia and decreased neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Neuroreport*, v. 9, p. 243–247, 1998.

SBD-GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1C. A importância da hemoglobina glicada (a1c) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes com diabetes mellitus: aspectos clínicos e laboratoriais Posicionamento oficial, 2004.

SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, Consenso Brasileiro Sobre Diabetes- Diagnóstico e classificação do diabetes melito, e tratamento do diabetes melito do tipo 2. 2002.

SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus-Diretrizes SBD. 2006.

SCHMID, H. Impacto cardiovascular da neuropatia autonômica do Diabetes Mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 51(2). p. 232-243, 2007.

SCHMITZ-PEIFFER, C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply. *Cellular Signalling*, v. 12, p. 583–594, 2000.

SENA, C. M, NUNES, E, GOMES, A, SANTOS, M. S., PROENÇA. T., MARTINS, M. I., SEIÇA, R. M. Supplementation of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol lowers glycated hemoglobin level and lipid peroxidation in pancreas of diabetic rats. *Nutr Res.* Feb, v. 28(2), p.113-21, 2008.

SHEHAB, S. A., & ATKINSON, M. E. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons. *Brain Res.* v. 372(1), p. 37– 44, 1986.

SILVA, H. R., C. C. M., NETO, L.B. C, LOPES, J.A.D., CITÓ, A. M. G. L. E CHAVES, M. H. Constituintes Químicos das Cascas do Caule de *Cenostigma macrophyllum*: Ocorrência de Colesterol. *Quim. Nova*, v. 30 (8). p. 1877-1881, 2007.

SILVESTRE, J. A. Hospitalizações SUS 1997. Coordenadoria da Atenção à Saúde do Idoso. Ministério da Saúde.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR. G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

SPIELCHLER, E. R. S; SPICHLER, D.; MARTINS, C.S.F .*et al.* Diabetic lower extremities amputation. *Rio de Janeiro, BR. Diabetologia*, vol. 41(A 279), pp. 90-96, 1998.

STEINBERG, H. O.; BRECHTEL, G.; JOHNSON, A.; FINEBERG, N.; BARON, A. D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* v. 94. p. 1172-1179, 1994.

SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A. A. Diabetic neuropathy--acontinuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* .,v. 16. p. 408-433, 2000.

SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; SIMA, A. A. Expression and localization of insulin receptor in rat dorsal root ganglion and spinal cord. *J Peripher Nerv Syst.* v. 7. p. 44-53, 2002.

SUGIMOTO, K.; MURAKAWA, Y.; ZHANG, W.; XU, G.; SIMA, A. A. Insulin receptor in rat peripheral nerve: its localization and alternatively spliced isoforms. *Diabetes Metab Res Rev.* v. 16. p. 354-363, 2000.

SWEENEY, G.; KLIP, A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how? *Mol Cell Biochem.*v. 182. p. 121-133, 1998

THE 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, p. 977-986, 1993.

THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* v.20. p. 1183-97, 1997.

TOKER, G. *et al.* Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). *Journal of Ethnopharmacology.* v. 95, p. 393–397, 2004.

TORQUATO M.T.C.G. *et al.* Prevalence of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in the Urban Population Aged 30-69 Years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Sao Paulo Med. J.* 121(6), 2003.

TREJO-GONZALEZ, A., GABRIEL-ORTIZ G, PUEBLA-PDREZ, A. M., HUIZAR-CONTRERAS, M. D., MUNGUIA-MAZARIEGOS, M. R. DEL., MEJIA-ARREGUIN, S., CALVA, E. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology,* v. 55, p. 27-33, 1996.

TSUDA, M., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., UENO, S., KOIZUMI, S., UEDA, H., IWANAGA, T., et al. Downregulation of P2X3 receptor-dependent sensory functions in A/J inbred mouse strain. *Eur J Neurosci.* v. 15(9), p. 1444– 1450, 2002

UEDA, H. In vivo molecular signal transduction of peripheral mechanisms of pain. *Jpn J Pharmacol.* v. 79(3), p. 263– 268, 1999.

UEDA, H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacology & Therapeutics.* v. 109. p. 57 – 77, 2006.

UEDA, H., INOUE, M., YOSHIDA, A., MIZUNO, K., YAMAMOTO, H., MARUO, J., et al. Metabotropic neurosteroid/s-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. *J Pharmacol Exp Ther.* v. 298(2), p. 703– 710, 2001.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33. *Lancet.* v. 352. p. 837-53, 1998.

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ.* v. 317. p. 703-13, 1998.

VANDERAH, T.W., SUENAGA, N. M., OSSIPOV, M. H., MALAN, Jr. T. P., Lai, J., & Porreca, F. Tonic descending facilitation from the rostral ventromedial medulla mediates opioid-induced abnormal pain and antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* v. 21(1), p. 279– 286, 2001.

VILLAR, M. J., CORTES, R., THEODORSSON, E., WIESENFELD-HALLIN, Z., SCHALLING, M., FAHRENKRUG, J., et al. Neuropeptide expression in rat dorsal root

ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience*. v. 33(3), p. 587– 604, 1989.

WALKER, D. et al. Structural abnormalities do not explain the early functional abnormalities in the peripheral nerves of the streptozocin diabetic rat. *J. Anatom.* v. 195, p. 419–427, 1999.

WOOLF, C. J., MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet*. v. 353(9168), p. 1959–1964, 1999.

ZARUCHI, J. L. *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, Chapman & Hall: London, 1994.

ZHANG, J. M., SONG, X.J., LAMOTTE, R. H. Enhanced excitability of sensory neurons in rats with cutaneous hyperalgesia produced by chronic compression of the dorsal root ganglia, *J. Neurophysiol.*, v. 82, p. 3359–3366, 1999.

ZHANG, X., de ARAUJO LUCAS, G., ELDE, R., Wiesenfeld-Hallin, Z., & Hokfelt, T. Effect of morphine on cholecystinin and muopioid receptor-like immunoreactivities in rat spinal dorsal horn neurons after peripheral axotomy and inflammation. *Neuroscience*. v. 95(1), p. 197– 207, 2000.

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](#)