

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE -
MESTRADO

TONICLEY ALEXANDRE DA SILVA

**AÇÃO ANTI-DIABETES DO EXTRATO DAS
FLORES DE *Anacardium occidentale* L. EM
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS**

São Luís

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Silva, Tonicley Alexandre da
Ação anti-diabetes do extrato das flores de *Anacardium occidentale* L. em camundongos diabéticos não obesos /
Tonicley Alexandre da Silva. – São Luis, 2010.

– 68 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientadora: Rosane Nassar Meireles Guerra

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2010.

1. *Anacardium occidentale* L. 2. Diabetes. 3. Flores
I. Título.

CDU: 634.573

TONICLEY ALEXANDRE DA SILVA

AÇÃO ANTI-DIABETES DO EXTRATO DAS FLORES DE *Anacardium occidentale* L. EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Mestrado da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosane Nassar Meireles Guerra

São Luís

2010

TONICLEY ALEXANDRE DA SILVA

AÇÃO ANTI-DIABETES DO EXTRATO DAS FLORES DE *Anacardium occidentale* L. EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS NÃO OBESOS

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia / / , considerou o(a) candidato(a)

() APROVADA

() REPROVADA

1) Examinador _____

2) Examinador _____

3) Examinador _____

4) Presidente (Orientador) _____

Para:

Maria José, mãe e inspiração de vida
João Batista, pai e grande incentivador

Minha irmã Abgail

Meus avôs Francisco e Pedro

Minhas avós Letícia e Joana

AGRADECIMENTOS

A DEUS que conduz a minha vida e tem abençoado todos os meus passos.

À minha orientadora, Profa. Dra. ROSANE NASSAR MEIRELES GUERRA, mestra e inspiração profissional, que compartilhou muito do seu tempo, talento e competência, tornando possível a elaboração deste trabalho.

À PRISCILA SOUSA BARCELLOS por sua inestimável colaboração nos trabalhos experimentais, nas discussões teóricas e pelo apoio em todo o processo de desenvolvimento deste trabalho.

À LUECYA CARVALHO, por sua ajuda durante toda a realização dos trabalhos experimentais.

Às professoras Flavia Raquel Fernandes do Nascimento e Flavia Maria do Amaral pelas valiosas contribuições na qualificação.

A todos os amigos do Laboratório de Imunofisiologia, por suas importantes sugestões, colaboração nos trabalhos experimentais e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Maranhão - FAPEMA pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

*“A pessoa que pensa que sabe alguma coisa ainda
não tem a sabedoria que precisa”*

1 Coríntios 8: 2

RESUMO

Este trabalho avaliou o efeito agudo, subcrônico e crônico do extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale* L. (EH), família Anacardiaceae, na fisiopatologia da diabetes mellito em camundongos diabéticos não obesos (NOD). Os animais foram tratados com três doses diferentes do EH (5, 50 e 500 mg/Kg). Camundongos NOD fêmeas com seis meses de idade foram submetidos a teste de tolerância oral a glicose após o tratamento agudo. Também foi avaliado o efeito subcrônico (6 semanas) e crônico (13 semanas) das diferentes doses do EH, considerando como parâmetros: variação glicêmica; consumo de água e ração; variação ponderal; hemoglobina glicada; triglicérides; colesterol; poliúria; glicosúria; excreção urinária de proteína. A produção de citocinas e produção de insulina foi avaliada por ensaio imunoenzimático ao final do tratamento crônico. O EH5 reduziu o pico glicêmico no teste de tolerância oral após tratamento agudo e a glicemia no grupo após o tratamento crônico. Nesse mesmo grupo o EH5 também reduziu o consumo de água e de ração, bem como o percentual de hemoglobina glicada, a poliúria e a glicosúria. Animais tratados cronicamente com EH5 apresentaram aumento na produção de IL-10 e IL-4. O tratamento com EH50 aumentou o pico glicêmico no teste de tolerância oral, e após tratamento crônico aumentou o consumo de água e ração, bem como a concentração sérica de triglicérides. O tratamento crônico com EH500 reduziu o peso dos animais, o consumo de água e ração, e em contrapartida aumentou a concentração sérica de colesterol total. Com base nos resultados concluímos que extrato das flores de *Anacardium occidentale*, na dose de 5mg/Kg, induziu efeito benéfico no tratamento da diabetes mellito apenas possivelmente por mecanismo de estimulação da secreção de insulina e modulação imunológica da insulite a partir da produção de IL10.

Palavras-chave: flores, *Anacardium occidentale*, diabetes

ABSTRACT

This study evaluated the acute, sub-chronic and chronic effect of the hidroalcoholic extract of *Anacardium occidentale* L. flowers (HE), family Anacardiaceae, on the physiopathology of the diabetes mellitus on non obese diabetic mice (NOD). The animals were treated with 5, 50 and 500 mg/Kg of HE, by oral route. Female NOD mice, with 6 months of age, were submitted to glucose oral tolerance test. The sub-chronic effect was evaluated after 6 weeks of and the chronic effect after 13 weeks of treatment with the different doses of the HE. It was evaluate the followed parameters: Blood glucose concentrarion; water and chow consumption; weight; glycated hemoglobin; triglycerides; cholesterol; polyuria; glycosuria; excretion of protein in urine; cytokine and insulin concentration. The treatment with HE5 reduced either the glucose increase at the oral tolerance test or the glucose concentration after chronic treatment reduced the glycemia. The same treatment also reduced the water and chow intake, the glycated hemoglobin levels, polyuria and glycosuria. The group acutely treated with HE50 showed an increased glucose level at the oral tolerance test of. The chronically treated with HE50 there was an increased intake of water and food, as well as a significant increase on the seric concentration of triglycerides. Treatment with HE500 resulted in reduction of the weight and food and water intake, besides it result in an increasing on the seric concentration of total cholesterol. Based on these result it was possible to conclude that the extract of *Anacardium occidentale* flowers induced a beneficial effect in the treatment of the diabetes mellitus using a dose of 5mg/Kg, possibly due to a stimulation on the insulin secretion and immunological modulation of the insulinitis by the increase on IL-10 production.

Keywords: flower, *Anacardium occidentale*, diabetes

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	10
3 CAPÍTULO I - (Ação anti-diabetes do extrato das flores de <i>Anacardium occidentale</i> l. em camundongos diabéticos não obesos)	11
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO A – Normas para submissão de artigo a BMC Complementary and Alternative Medicine	43

LISTA DE FIGURAS

	P.
FIGURA 1 Tolerância oral a glicose em camundongos NOD tratados com extrato hidroalcoólico de flores de <i>Anacardium Occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg	18
FIGURA 2 Variação glicêmica de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas	19
FIGURA 3 Variação ponderal de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas	20
FIGURA 4 Concentração sérica de insulina de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas.....	24
FIGURA 5 Concentração de citocinas IL-4; IL-10; TNF α e IFN- γ de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas	25

LISTA DE TABELAS

	P.
Tabela 1	
Consumo diário de água e ração de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas	21
Tabela 2	
Análise bioquímica em camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas.....	22
Tabela 3	
Análise da urina de camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de <i>Anacardium occidentale</i> nas doses de 5, 50 e 500 mg/Kg, durante 13 semanas.....	23
Tabela 4	
Coeficiente de correlação linear de Pearson entre as citocinas e as variáveis peso, glicose sanguínea, hemoglobina glicosilada, triglicérides, colesterol total, insulina, consumo de água e ração, volume de urina, glicose e proteína urinária.....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NOD	diabético não obeso
WHO	Organização Mundial de Saúde
HLA	antígeno leucocitário humano
MHC	complexo de histocompatibilidade
SUS	Sistema Único de Saúde
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
IFN-γ	Interferon gama
EH	extrato hidroalcoólico
IL	Interleucina

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellito

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2000 existiam 180 milhões de pessoas em todo o mundo com diabetes, conforme sua projeção haverá um aumento para 366 milhões no ano de 2030 (Wild *et al.*, 2004; WHO, 2009).

A estimativa da mortalidade global atribuída a diabetes em 2000 foi de 2,9 milhões de mortes, o equivalente a 5,2 % de todas as mortes registradas no mundo. A mortalidade atribuída ao diabetes correspondeu de 2 a 3% das mortes em países pobres e acima de 8% das mortes em países como Estados Unidos, Canadá e países do oriente médio. Em pessoas entre 35 e 64 anos de idade, de 6 a 27% das mortes foram atribuídas ao diabetes. Os estudos também projetam um aumento de 80% no número de mortes por diabetes entre 2006 e 2015 (Roglic, *et al.*, 2005; WHO, 2008).

No Brasil estima-se que mais de 4,5 milhões de pessoas possuem diabetes e que provavelmente este número vai aumentar para 11,3 milhões até 2030 (WHO, 2009). A Diabetes mellito é uma das principais causas de morte nos países ocidentais e apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas conseqüências letais (Roglic, *et al.*, 2005).

Diabetes mellito é uma doença crônica que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente para suprir as necessidades do organismo, ou alternativamente, quando o organismo não consegue utilizar efetivamente a insulina produzida. A insulina é o hormônio que regula o açúcar do sangue, a hiperglicemia é a elevação deste açúcar no sangue sendo muito comum na diabetes descontrolada o que com o passar do tempo, causa danos a muitos sistemas orgânicos especialmente nos sistemas nervoso e vascular (WHO, 2008).

Alterações na tolerância à glicose e na glicemia em jejum são condições intermediárias na transição entre a normalidade e a diabetes. As pessoas com

alteração na tolerância à glicose e glicemia em jejum encontram-se com um alto risco de desenvolver diabetes mellito (Gross *et al.*, 2002; WHO, 2006).

Os sintomas da diabetes incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia e visão turva. As complicações agudas podem levar a cetoacidose diabética e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica (ADA - TECDCDM, 1997; Berne, 2000; WHO, 2006; Berry, 2009).

Dois tipos de diabetes são comumente descritos como principais: o tipo 1 ou insulino dependente e o tipo 2 ou não insulino- dependente. A diabetes tipo 1 é caracterizada por produção insuficiente de insulina decorrente da destruição das células do pâncreas que produzem insulina. É mais incidente na puberdade. Nesse caso, os indivíduos que desenvolvem a doença dependem de insulina exógena e sem administração diária de insulina a diabetes é rapidamente fatal (WHO, 2008). A diabetes tipo 2 é resultado do uso ineficaz da insulina pelo organismo. 90% das pessoas das pessoas desenvolvem esse tipo de diabetes no mundo. Os sintomas da diabetes são comuns aos dois tipos, embora nos pacientes com o tipo 2 eles sejam freqüentemente menos acentuados. Como resultado, a doença pode ser diagnosticada vários anos depois de seu início, quando começam a surgir as suas primeiras complicações (Wild *et al.*, 2004; WHO, 2009).

A retinopatia diabética que é um exemplo de complicações da diabetes, é também a mais importante causa de cegueira em todo o mundo. Ocorre como resultado do acúmulo de danos aos pequenos vasos sanguíneos da retina. Aproximadamente 2% das pessoas ficam cegas, depois de 15 anos de diabetes e aproximadamente 10% desenvolvem prejuízo visual severo (Gross *et al.*, 2002).

Outra complicação comum da diabetes é a neuropatia diabética, sendo o resultado dos danos aos nervos em decorrência da diabetes, afetando até 50% dos diabéticos. Embora diferentes problemas possam ocorrer como resultado da neuropatia diabética, os sintomas mais comuns são formigamento, dor, entorpecimento ou fraqueza nos pés e mãos. Combinado com a redução do fluxo sanguíneo a neuropatia nos pés aumenta a chance da formação de úlceras e eventual amputação dos membros (Gross *et al.*, 2002; WHO, 2008).

A diabetes está entre as principais causas de insuficiência renal sendo que esta é a causa da morte de 10 e 20% das pessoas com diabetes. A diabetes também aumenta o risco de insuficiência cardíaca e infarto, estudos estimam que 50% das pessoas com diabetes morrem de doença cardiovascular, principalmente de insuficiência cardíaca e infarto. (Gross *et al.*, 2002; WHO, 2008).

O risco de morte entre pessoas com diabetes é pelo menos o dobro das pessoas sem diabetes (Roglic *et al.*, 2005; WHO, 2008).

Um ponto comum entre as duas formas de diabetes está relacionado ao comprometimento imunológico do indivíduo, ao aumento na produção de anticorpos auto-reativos e deficiência na produção e/ou ação da insulina (Nogueira, 2003; Silva *et al.*, 2003). Também ambos os tipos de diabetes são modulados por fatores ambientais durante vida pré-natal (Barker, 1998; Dahlquist *et al.*, 1999; Hattersley e Tooke, 1999).

Além disso, nos dois tipos de diabetes ocorre bloqueio da ação metabólica da insulina, que é o hormônio mediador do transporte de glicose através das membranas celulares (Gross *et al.*, 2002; Homo-Delarche, 2004; WHO, 2006).

Baseado em observações endocrinológicas, o diabetes tipo 1 pode ser considerado uma forma acelerada da diabetes tipo 2 cuja evolução é complicada por alterações do sistema imunológico, provavelmente associado com predisposição genética dependente do tipo de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) de humanos e H-2 de roedores (Delovitch e Singh, 1997; Beyan *et al.*, 2003).

Esta perspectiva pode melhorar a conduta terapêutica de pacientes com diabetes auto-imune latente que apresentam resistência a insulina e lenta agressão auto-imune das ilhotas pancreáticas. Além disso, é crescente a associação entre inflamação e a patogênese da diabetes tipo 2 e de suas complicações (Pickup *et al.*, 1997; Fernandez-Real e Ricart, 1999; Dandona *et al.*, 2003).

A diabetes e suas complicações impõem significativa consequência econômica aos indivíduos, famílias, sistemas de saúde e países. No continente americano foi estimado em US\$ 65,2 bilhões os custos diretos e indiretos com a

diabetes, já no Brasil os custos foram estimados em US\$ 22,6 bilhões ao ano (Barceló, A. *et al.*, 2003). Dessa forma, os custos financeiros envolvidos no tratamento, recuperação e manutenção de pacientes portadores dessa patologia, são altos para a sociedade.

Neste contexto surge a busca de alternativas eficazes e menos onerosas no tratamento dessa patologia, dentre as quais se incluem as espécies vegetais com propriedades terapêuticas.

1.2 Atividade hipoglicemiante do *Anacardium occidentale* L.

Muitas espécies têm sido utilizadas popularmente, ou experimentalmente, no tratamento dos sintomas da diabetes (Gbodossou e Vidjin, 2002; Giuseppina, 2005; Samad *et al.*, 2009). Foram relacionadas mais de 725 gêneros em 183 famílias, estendendo-se filologicamente das algas marinhas e fungos até plantas superiores (Giuseppina, 2005).

Na medicina chinesa tradicional, 82 espécies vegetais têm sido usadas como medicamentos naturais para o tratamento da diabetes melito e suas complicações (Li *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação pelos quais as plantas reduzem a concentração sanguínea de glicose tem sido relacionado aos seguintes fatores: aumento da liberação de insulina a partir da estimulação das células β pancreáticas; resistência aos hormônios que aumentam a concentração de glicose; aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; diminuição da perda de glicogênio; aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos; eliminação de radicais livres; resistência à peroxidação de lipídeos; correção da desordem metabólica e aumento da microcirculação do sangue no organismo (Marles e Farnsworth, 1995; Said *et al.*, 2002; Volpato *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2003).

A maioria das plantas que são utilizadas como antidiabéticas ao serem avaliadas farmacologicamente demonstraram ter atividade hipoglicemiante e possuir constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes

hipoglicemiantes. Entretanto, análises posteriores revelaram grande variedade de mecanismos de ação que podem levar ao efeito hipoglicemiante, nem todos terapeuticamente úteis (Marles e Farnsworth, 1995; Said *et al.*, 2002; Volpato *et al.*, 2002; Giuseppina, 2005).

Uma dessas plantas que tem demonstrado atividade hipoglicemiante experimentalmente e que algumas populações utilizam empiricamente para o tratamento da diabetes mellito é a espécie *Anacardium occidentale* L. (Kamtchouing *et al.*, 1998; Tedong *et al.*, 2006).

Anacardium occidentale, família Anacardiaceae, popularmente conhecido como cajueiro, é uma espécie nativa do Brasil com ampla distribuição na região Nordeste do país, incluindo o estado do Maranhão. Os exemplares dessa espécie são árvores de copa baixa, com altura que varia entre 5 e 10 m. Apresentam folhas simples, inteiras, oblongas e flores róseas, pequenas dispostas em panículas terminais. O nome caju é oriundo da palavra indígena “acaiú” e corresponde à parte carnosa que é um pseudofruto formado pelo pedúnculo do fruto. O fruto é uma noz popularmente conhecida como castanha (Cruz, 1985; Albuquerque, 1989; Lorenzi, 2002).

Diversas propriedades farmacológicas são atribuídas ao *Anacardium occidentale*: o extrato da casca mostrou efeito hipotensivo e anti-arrítmico em cães (West e Box, 1972; West *et al.*, 1973), a fração metanólica do extrato hidroalcoólico das folhas induziu efeito antiulcerogênico em ratos e efeito tóxico foi observado no tratamento agudo com doses de até de 2000 mg/Kg (Konan e Bacchi, 2007; Konan *et al.*, 2007)

Estudos realizados com diferentes partes do *Anacardium occidentale* também atestam sua atividade como antitussígeno, anti-séptico, anti-sifilítico, diurético, antidiabético, antiinflamatório, anti-asmático e cicatrizante entre outras (Akinpelu, 2001; Lorenzi, 2002; Menezes *et al.*, 2002; Olajide *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; Tedong *et al.*, 2006).

O efeito protetor do extrato aquoso das folhas de *Anacardium occidentale* foi avaliado na diabetes induzida por estreptozotocina em ratos Wistar. Os ratos

tratados com 175 mg/kg do extrato, duas vezes por dia; 2 dias antes da indução de diabetes com estreptozotocina (STZ), apresentaram após 3 dias, aumento de 48% na concentração sanguínea de glicose. Em contrapartida ocorreu aumento de 208% nos ratos no grupo controle. Além disso, os animais tratados previamente não apresentaram glicosúria, tiveram ganho de peso normal e não aumentaram o consumo de comida e água. Animais do grupo controle apresentaram glicosúria, perda de peso, polifagia e polidipsia. Estes resultados indicam o papel protetor do extrato de *Anacardium occidentale* sobre a ação diabetogênica da STZ. (Kamtchouing *et al.*, 1998; Tedong *et al.*, 2006).

Em outro estudo foi avaliado o efeito hipoglicemiante de extratos da casca do *A. occidentale* em ratos Wistar normais (normoglicêmicos) e em animais em que a diabetes foi induzida por estreptozotocina. Os tratamentos resultaram em reduções dose-dependentes, das concentrações sanguíneas de glicose em ratos normais e diabéticos. A dose única de 800 mg/kg, de *A. occidentale* reduziu significativamente as concentrações sanguíneas de glicose nos ratos normais e diabéticos. (Ojewole, 2003).

Outro estudo também observou que a administração intravenosa do extrato hexânico da casca do *Anacardium occidentale*, em cães saudáveis, induziu significativa redução da glicose sanguínea de. A busca do princípio ativo no extrato hexânico resultou no isolamento e caracterização de dois compostos, o estigmast-4-en-3-ol e estigmast-4-en-3-ona. Estas substâncias foram purificadas por cromatografia e as estruturas foram caracterizadas por espectroscopia. Ambas as substâncias produziram significativa atividade hipoglicemiante após administração intravenosa da dose de 1,3 mg/Kg. A casca do *Anacardium occidentale*, demonstrou efeito hipoglicemiante provavelmente pela presença destes dois compostos (Alexander-Lindo *et al.*, 2004).

Recentemente *Anacardium occidentale* foi inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS, 2009). A finalidade da RENISUS é subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, inclusive nas ações que serão desenvolvidas também pelos outros ministérios participantes do Programa Nacional

de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Terá também a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos), o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos (MS, 2010).

1.3 Modelos experimentais de diabetes

Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo da diabetes são roedores tratados com aloxano ou estreptozotocina (STZ), um glicosídeo nitroso natural isolado de *Streptomyces achromogenes*. A STZ estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e disfunção das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Este xenobiótico tem sido usado para induzir a diabetes com concomitante deficiência de insulina. Uma dose simples em ratos pode produzir um modelo experimental da diabetes tipo II. O aloxano, um derivado da pirimidina, é uma toxina muito seletiva das células β pancreáticas por causar a inibição da glicoquinase. No entanto, apesar de ser um bom modelo para a diabetes melito, há muitos problemas devido à sua instabilidade química, metabolismo rápido e alguns fatores, tais como dieta e idade, que tornam quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses de aloxano e sua concentração efetiva no pâncreas (Marles e Farnsworth, 1995).

Dessa forma, a utilização de camundongos diabéticos não obesos (NOD) parece ser uma boa alternativa para compreensão dos mecanismos de regulação e evolução de diabetes em animais.

Os camundongos NOD são modelos experimentais de diabetes tipo 1, patologia observada predominantemente em crianças e adultos jovens. Esse tipo de diabetes, além de ter origem multigênica, é fortemente dependente de fatores ambientais tais como: estresse, presença de infecções e tipo de dieta (Homo-Delarche, 1997; Dahlquist *et al.*, 1999; Atkinson e Eisenbarth, 2001; Todd e Wicker, 2001).

Em camundongos NOD, o mecanismo imunofisiológico que acarreta o desenvolvimento da diabetes, inicia-se com o acúmulo de macrófagos e células dendríticas, ao redor das ilhotas e ductos pancreáticos dos animais, logo no desmame, ou seja, por volta de 3ª semana de idade (Jansen *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 1996; Rosmalen *et al.*, 2002). Subseqüentemente, células T migram para o pâncreas onde se acumulam ao redor dos ductos e ilhotas, a seguir macrófagos, células dendríticas e mais células T infiltram-se nas ilhotas ocasionando insulite. Como resultado, ocorre a destruição das células β e o aparecimento de sintomas típicos da diabetes tipo 1 (Jansen *et al.*, 1994; Rosmalen *et al.*, 2002).

Em geral, as fêmeas NOD, cujas ilhotas são precocemente infiltradas, ficam diabéticas a partir dos 3 meses de idade, portanto, mais cedo e com maior freqüência do que nos machos. Cerca de 80% das fêmeas e 40% dos machos de camundongos NOD ficam diabéticos aos 6 meses de idade (Jansen *et al.*, 1994; Rosmalen *et al.*, 2002).

Embora não reproduzindo todas as características clínicas da diabetes tipo 1 humano, os camundongos NOD são um bom modelo para a compreensão e análise das interações neuroendócrinas e imunes complexas que estão por baixo do início e da progressão da diabetes tipo 1 e potencialmente relacionadas com fatores ambientais. O modelo tornou possível para os cientistas elucidarem eventos particulares relativos a alterações nas ilhotas pancreáticas que ocorrem durante o período perinatal e a fase transitória prematura de hiperatividade das células β (Rosmalen *et al.*, 2002; Saravia e Homo-Delarche, 2003).

Vários estudos têm utilizado o modelo de diabetes do camundongo NOD para avaliar o efeito de diversos extratos de produtos naturais, principalmente plantas, na fisiopatologia da doença na referida linhagem, a fim de identificar nessas espécies de plantas testadas atividade terapêutica passível de utilização pela população (Petlevski *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008).

Como o uso de espécies vegetais no tratamento da diabetes ainda ocorre, na maioria das vezes, de forma empírica e devido à necessidade de avaliar novos compostos com atividade sobre os principais sintomas da diabetes a presente

proposta visa avaliar os efeitos do extrato das flores de *A. occidentale* no tratamento da diabetes mellito, com avaliação pré-clínica do extrato hidroalcoólico obtido das suas flores, utilizando camundongos NOD, buscando investigar a atividade anti-diabetogênica alegada popularmente.

2. OBJETIVOS:

Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos dos extratos das flores de *Anacardium occidentale* na diabetes murina considerando sua repercussão sobre a produção de insulina e de citocinas.

Objetivos Específicos:

- Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato no teste de tolerância oral após tratamento agudo,
- Avaliar os efeitos subcrônicos e crônicos do tratamento sobre a concentração de glicose e hemoglobina glicada,
- Analisar os efeitos do tratamento sobre a urinálise.
- Avaliar o efeito do tratamento sobre a concentração sérica de insulina e citocinas.

3 CAPITULO I

Ação anti-diabetes do extrato das flores de *Anacardium occidentale* L. em camundongos diabéticos não obesos

(A ser submetido a revista BMC Complementary and Alternative Medicine)

INTRODUÇÃO

A diabetes mellito é uma doença crônica decorrente de uma insuficiente produção de insulina pelo pâncreas ou da não efetiva utilização da insulina pelo organismo (1-4).

Vários sintomas são comuns à diabetes tais como: sede e fome excessivas, fraqueza muscular, perda de peso, elevação do nível de glicose no sangue e excreção de glicose pela urina (5-7).

A Organização Mundial de Saúde estima que mais de 180 milhões de pessoas em todo o mundo possuem diabetes e que provavelmente este número vai mais que dobrar até 2030. Em 2005 foi estimado que 1,1 milhões de pessoas em todo o mundo morreram em decorrência da diabetes e foi projetado um aumento de 80% no número de mortes por diabetes entre 2006 e 2015 (8-10).

No Brasil, estima-se que mais de 4,5 milhões de pessoas possuem diabetes e que provavelmente este número vai aumentar para 11,3 milhões até 2030 (11).

Dessa forma, os custos econômicos envolvidos no tratamento, recuperação e manutenção de pacientes portadores dessa patologia, são enormes para a sociedade (8).

Embora existam no mercado varias opções de drogas para o tratamento da diabetes, novos agentes terapêuticos ainda são necessários e requeridos, pois o objetivo do tratamento para pacientes com diabetes tem evoluído significativamente durante os últimos 80 anos, de prevenção da morte iminente, para alívio dos sintomas e agora a normalização dos níveis de glicose a fim de evitar complicações diabéticas (12).

Neste contexto, surge a busca de alternativas mais eficazes e menos onerosas no tratamento dessa patologia, dentre as quais encontram-se as espécies

vegetais, novos produtos bioativos, medicamentos semi-sintéticos e protótipos para síntese de módulos mais ativos e seletivos (Cowan, 1999; Yunes, Calixto, 2001; Pinso *et al*, 2002; Ansitony *et al*, 2003).

Muitas espécies vegetais têm sido utilizadas, popularmente ou experimentalmente, no tratamento dos sintomas da diabetes (12-18). Entre elas podemos citar a espécie *Anacardium occidentale* que apresenta atividade hipoglicemiante demonstrada em alguns experimentos (19-22)

Anacardium occidentale L., família Anacardiaceae, popularmente conhecido como cajueiro, é uma espécie nativa do Brasil com ampla distribuição na região Nordeste do país, incluindo o estado do Maranhão. Os exemplares dessa espécie são árvores de copa baixa, com altura que varia entre 5 e 10 m. Apresentam folhas simples, inteiras, oblongas, e flores róseas, pequenas dispostas em panículas terminais. O nome caju é oriundo da palavra indígena “acaiú” e corresponde à parte carnosa que é um pseudofruto formado pelo pedúnculo do fruto. O fruto é uma noz popularmente conhecida como castanha (23-25).

À espécie *Anacardium occidentale* são atribuídas diversas propriedades farmacológicas, que atestam sua atividade como antitussígeno, anti-séptico, anti-sifilítico, diurético, antidiabético, antiinflamatório, anti-asmático cicatrizante entre outras (22, 23, 26-29).

Recentemente, a espécie foi inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde pelo Ministério da Saúde do Brasil (30).

Experimentos efetuados em ratos tratados por estreptozotocina e tratados com extrato das folhas de *A. occidentale* mostraram um efeito protetor na evolução de diabetes. O tratamento reduziu as conseqüências da doença tendo ação sobre: peso corporal; concentração sérica de glicose e glicosúria (19, 22).

Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo de diabetes são roedores tratados com estreptozotocina ou aloxana (31). Apesar da indução de diabetes por estreptozotocina e aloxana serem bons modelos para o estudo de diabetes, esses modelos são também dependentes de uma série de fatores que podem alterar os resultados. Os principais problemas são: instabilidade química dos compostos, metabolismo rápido das drogas, tipo de dieta, idade e espécie utilizada nos ensaios. Esse conjunto de variáveis tornam quase impossível estabelecer uma relação clara

entre as doses dessas duas drogas e sua concentração efetiva no pâncreas (31). Dessa forma, a utilização de camundongos diabéticos não obesos (NOD) aparece como uma boa alternativa para compreensão dos mecanismos de regulação e evolução de diabetes em animais.

Em camundongos NOD o mecanismo imunofisiológico que acarreta o desenvolvimento de diabetes inicia-se com o acúmulo de macrófagos e células dendríticas, ao redor das ilhotas e ductos pancreáticos dos animais, logo no desmame, ou seja, por volta de 3ª semana de idade (36-38). Subseqüentemente, células T migram para o pâncreas onde se acumulam ao redor dos ductos e ilhotas, a seguir macrófagos, células dendríticas e células T infiltram-se nas ilhotas ocasionando insulite. Como resultado ocorre a destruição das células β e o aparecimento de sintomas típicos da diabetes tipo 1 (36, 38).

Estudos correlacionam a expressão de citocinas nas ilhotas pancreáticas com o desenvolvimento de diabetes autoimune em camundongos NOD demonstrando que a insulite destrutiva das células β está associado com aumento da expressão de citocinas de proinflamatórias (IL-1, TNF- α e IFN- α) e citocinas tipo 1 (IFN- γ , TNF- β , IL-2 e IL-12), enquanto que a insulite não destrutiva (benigna) está associado com aumento da expressão de citocinas tipo 2 (IL-4 e IL-10) e o tipo 3 (TGF- β). As citocinas (IL-1, TNF- α , TNF- β e IFN- γ) podem ser diretamente citotóxicas as células β induzindo a produção dos radicais livres óxido nítrico e oxigênio. Além disso, as citocinas podem sensibilizar células β para citotoxicidade mediada por células T (39).

Em geral, as fêmeas NOD, cujas ilhotas são precocemente infiltradas, ficam diabéticas a partir dos 3 meses de idade, portanto mais cedo e com maior frequência do que ocorre nos machos. Cerca de 80% das fêmeas e 40% dos machos de camundongos NOD ficam diabéticos aos 6 meses de idade (36, 38).

Como o uso de espécies vegetais no tratamento da diabetes ainda ocorre, na maioria das vezes, de forma empírica e devido a necessidade de avaliar novos compostos com atividade sobre os principais sintomas da diabetes, pelo interesse nacional de estudos com *Anacardium occidentale* via RENISUS do Ministério da Saúde do Brasil, o presente trabalho avaliou os efeitos dos extratos das flores de

Anacardium occidentale na diabetes murina considerando sua repercussão sobre a produção de insulina e de citocinas.

Para isso avaliou-se os efeitos do tratamento com o extrato no teste de tolerância oral após tratamento agudo, os efeitos subcrônicos e crônicos do tratamento sobre a concentração de glicose e hemoglobina glicada, bem como na urinálise, além de determinar a concentração de insulina e quantificar a produção de citocinas.

METODOLOGIA

Preparação do extrato hidroalcoólico

As flores foram coletadas na Universidade Federal do Maranhão, Campus do Bacanga, São Luis – MA, Brasil, no mês de julho de 2008, época da floração, no período das 7 às 8 horas da manhã, com auxílio de um instrumento de cortante afiado e um recipiente de coleta para não danificar as flores. O vegetal foi identificado e a exsicata está depositada no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão sob o nº 660/SLS/017213.

As flores foram secas, ao abrigo da luz solar, sob ventilação mecânica, a temperatura ambiente ($\pm 26^{\circ}\text{C}$), durante 7 dias. Após secas as flores foram moídas em moinho tipo faca, procedimento que resultou na obtenção de 700 g de pó. O pó foi então submetido à operação extrativa por remaceração em etanol a 70%, na proporção de 1/5, a temperatura ambiente, durante sete dias, cada etapa, de um total de 3 etapas, totalizando-se 21 dias. Ao final de cada etapa obteve-se o extrato bruto por filtração em papel de filtro. O rendimento do processo extrativo foi de 35%. O extrato hidroalcoólico (EH) foi evaporado sob pressão reduzida a 60°C , em evaporador rotatório, a 120 rpm. Alíquotas do extrato foram congelados a -18°C , para posterior liofilização. Após a liofilização o EH foi solubilizado em solução salina (NaCl 0,87%) na concentração de 300mg/mL para posterior preparação das doses a serem utilizadas nos ensaios. Nesse estudo os animais foram tratados com EH nas doses de 5; 50 e 500mg/Kg.

Tratamento dos animais

Para a realização dos ensaios foram utilizados camundongos diabéticos não obesos (NOD), fêmeas, adultas com idade de 6 meses e peso entre 18 g e 25 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão.

O projeto foi aprovado sob o número 007/2008 em 06/06/2008 pela Comissão de Ética Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 4 grupos, com 5 animais. Antes do início do tratamento todos os animais foram pesados. Em seguida, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas e ficaram em jejum por 10 horas. Os animais receberam EH nas doses de 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg e foram comparados ao grupo controle tratado com salina nos mesmos intervalos. Foi considerado como tratamento subcrônico e crônico o tratamento diário, por via oral, durante 6 e 13 semanas respectivamente, conforme a legislação brasileira, ANVISA (Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 e Portaria nº 116, de 08 de agosto de 1996). Na 6ª semana e ao final da 13ª semana, foram coletadas amostras de sangue, por punção do plexo retro-orbital, para realização de ensaios bioquímicos e imunológicos.

Avaliação do efeito sobre sinais da diabetes

Teste de tolerância oral: A atividade hipoglicemiante do extrato das flores de *Anacardium occidentale* foi avaliada após tratamento agudo pelo teste de tolerância oral. Após o jejum de 10 horas foi aferida a concentração de glicose. No momento seguinte os animais receberam, por via oral, uma solução de 4 g/Kg de glicose, em 200 µL. Cinco minutos após o desafio com glicose, os animais foram tratados com EH, via oral, nas doses de 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg. Os animais do grupo controle receberam salina no mesmo intervalo. A glicose sanguínea foi aferida nos intervalos de 10, 30, 60, 120 e 240 minutos após o tratamento com EH (17).

Urinálise: Antes do início do tratamento, após as 10 horas de jejum, e cada semana foram amostras de urina, para urinálise. As amostras de urinas foram

mantidas a 8°C até a realização dos ensaios que ocorreram até 2 horas após a coleta. A urinálise utilizou fitas reagentes Bio Color (Bioeasy®, Brasil). Foi feita a determinação quantitativa de sangue, bilirrubina, urobilinogênio, cetona, proteína, nitrito, glicose, pH, densidade e leucócitos. As análises foram realizadas em pool de urina dos 5 animais de cada grupo.

Glicemia: As avaliações sanguíneas foram realizadas nos mesmo intervalos que a urinálise, ou seja, após as 10 horas de jejum, antes do tratamento com os extratos e ao final de cada semana até a 13ª semana de tratamento. A concentração de glicose foi determinada com auxílio de glicosímetro digital (Biocheck TD-4225, Bioeasy, USA), em amostras de sangue obtidas na extremidade da cauda.

Análise bioquímica e imunológica: O sangue obtido por punção do plexo retroorbital foi utilizado para determinação de hemoglobina glicada. Uma alíquota das amostras de sangue foi centrifugada (1500 rpm) para obtenção do soro que foi utilizado para determinar por ensaio colorimétrico a concentração de triglicérides e colesterol conforme descrito pelo fabricante (LABTEST, Brasil).

A análise concentração sérica de insulina foi realizada por ensaio imunoenzimático usando o kit Ultra Sensitive Mouse Insulin, conforme orientações do fabricante (Crystal Chem's, USA).

A concentração das citocinas IL4, IL-10; TNF- α e IFN- γ foi quantificada no soro, por ensaio imunoenzimático, conforme método descrito pelo fabricante (eBioscience, USA).

Consumo: A avaliação ocorreu em gaiolas metabólicas onde os animais foram avaliados isoladamente durante 12 dias consecutivos e anteriores a 6ª e 13ª semana de tratamento.

Análise estatística

Os valores foram expressos por meio de média e desvio padrão de cada grupo avaliado, em seguida os dados foram submetidos a ANOVA, seguida do testes de Tukey-Kramer ou ao teste de Kruskal-Wallis e em seguida ao pós-teste de Dunns,

dependendo do ensaio. Em todos os casos foi considerado como nível de significância $p < 0,05$.

Realizou-se também a medição e avaliação do grau de relação existente entre as citocinas e demais variáveis utilizando o coeficiente de correlação linear de Pearson.

RESULTADOS

Avaliação do efeito do EH na tolerância oral a glicose:

Nos dois grupos experimentais o pico máximo de glicose sanguínea ocorreu no intervalo de 10 minutos (Figura 1).

Na Figura 1 é também possível observar que o tratamento com EH5 ocasionou redução significativa no pico máximo de glicose sanguínea, redução essa mantida no intervalo de 30 minutos. O tratamento com EH500 não apresentou resultados diferentes do controle não tratado.

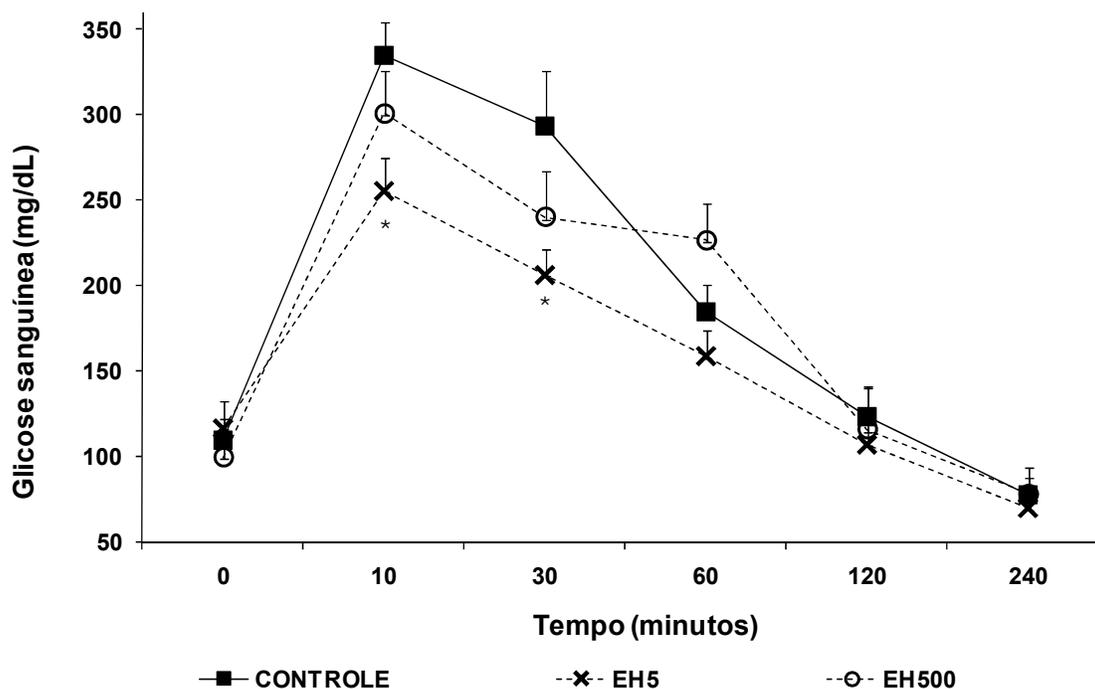


FIGURA 1: Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de flores de *A. occidentale* (EH) sobre a tolerância oral a glicose. Camundongos NOD receberam solução de glicose (4 mg/Kg), via oral, e receberam 5 minutos depois tratamento com 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg do extrato. A concentração de glicose sanguínea foi avaliada antes da administração da glicose e 10, 30, 60, 120 e 240 minutos depois do tratamento com EH. Os dados correspondem a média de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre a variação glicêmica:

A Figura 2 mostra que o tratamento com EH5 ocasionou significativa redução na concentração de glicose nos intervalos da 1ª e 13ª semana. Resultados semelhantes foram obtidos após tratamento com EH500 na primeira semana. Nos demais grupos nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

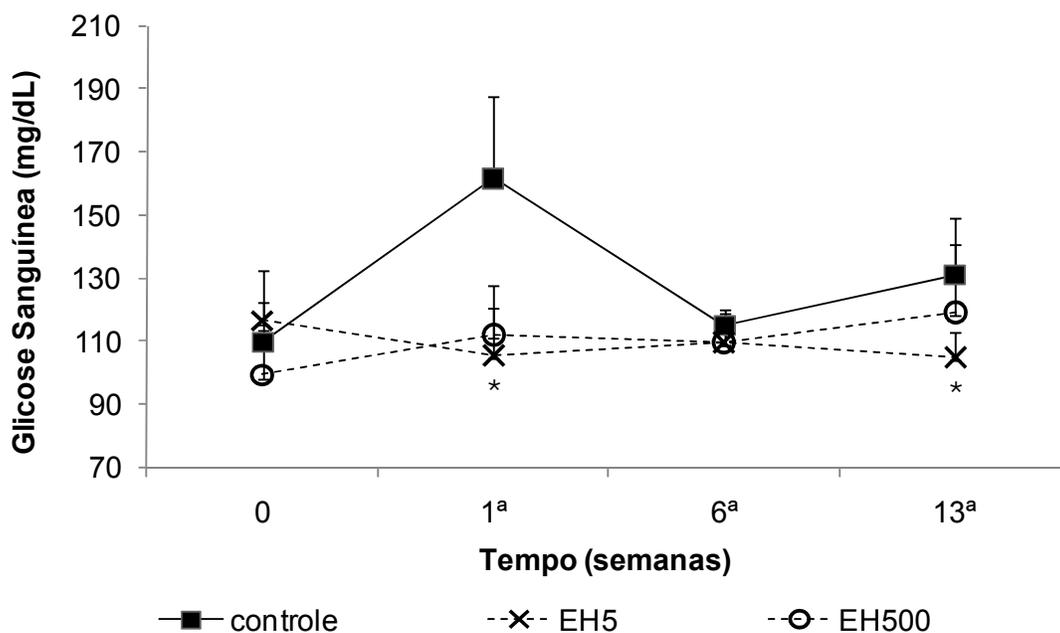


FIGURA 2: Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de flores de *A. occidentale* (EH) sobre a variação glicêmica. Camundongos NOD receberam solução de glicose (4 mg/Kg), via oral, e receberam 5 minutos depois tratamento com 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg do extrato. A concentração de glicose sanguínea foi avaliada. A glicemia sanguínea foi avaliada antes do tratamento e ao final da 1ª, 6ª e 13ª semana. Os dados correspondem a média de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre a variação ponderal:

Apenas o tratamento com EH500 ocasionou redução ponderal no intervalo entre a 1ª e a 6ª semana. Nos demais os resultados obtidos não foram diferentes do controle.

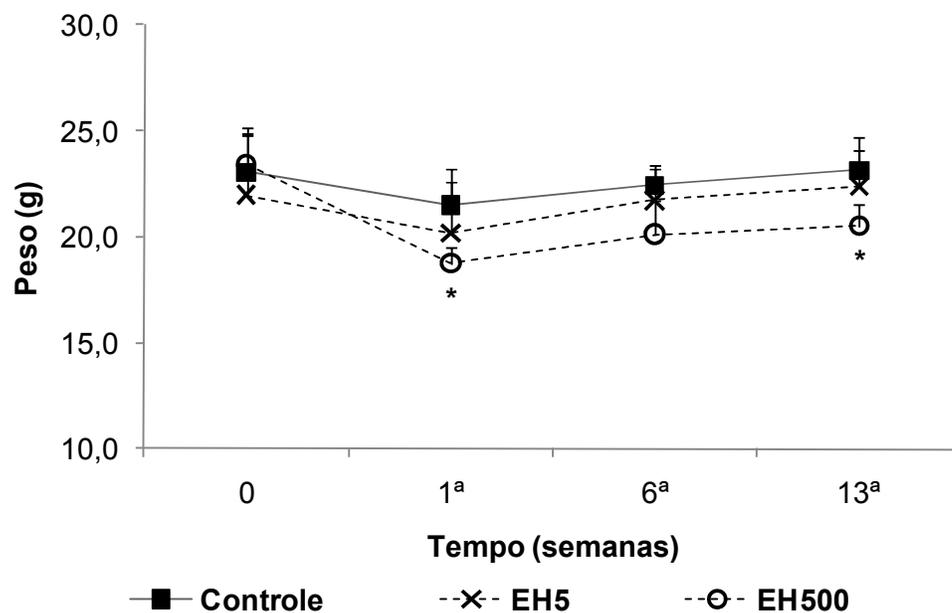


FIGURA 3: Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de flores de *A. occidentale* sobre a variação ponderal. Camundongos NOD receberam diariamente por 13 semanas EH nas doses, nas doses de 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg. O peso foi aferido antes do tratamento e ao final da 1ª, 6ª e 13ª semana. Os dados correspondem a média de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre o consumo de água e ração:

Ocorreu redução do consumo de água e ração nos grupos submetidos ao tratamento subcrônico e crônico com EH5 e EH500 (Tabela 1).

Tabela 1 - Consumo diário de água e ração por camundongos NOD tratados com o extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale* nas doses de 5 e 500 mg/Kg.

GRUPOS	CONSUMO ^a			
	Subcrônico		Crônico	
	Água (mL)	Ração (g)	Água (mL)	Ração (g)
Controle	5,9 ± 1,0	3,3 ± 0,4	4,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1
EH5	3,9 ± 0,1*	2,9 ± 0,3*	3,5 ± 0,4*	2,1 ± 0,1*
EH500	3,1 ± 0,4*	2,4 ± 0,5*	2,6 ± 0,2*	1,7 ± 0,1*

(a) Os dados correspondem à média ± desvio padrão de 5 animais/grupo avaliados, isoladamente durante 12 dias consecutivos;

(*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre a bioquímica sanguínea:

Apenas o tratamento com EH5 reduziu a concentração de hemoglobina glicada e nenhuma das doses alterou a concentração de triglicérides. Em contrapartida a concentração sérica de colesterol total aumentou apenas no grupo EH500 após tratamento subcrônico (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise bioquímica de camundongos NOD tratados cronicamente com 5 e 500mg/Kg do extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale*

ANÁLISE BIOQUÍMICA						
GRUPOS	Hemoglobina Glicada (%)		Triglicérides (mg/dL)		Colesterol total (mg/dL)	
	Subcrônico	Crônico	Subcrônico	Crônico	Subcrônico	Crônico
Controle	4,2 ± 1,3	12,0 ± 3,1	470 ± 93	291 ± 208	77 ± 14	178 ± 25
EH5	4,4 ± 1,9	9,0 ± 1,0*	391 ± 64	165 ± 85	86 ± 10	146 ± 22
EH500	3,0 ± 0,4	9,5 ± 1,6	657 ± 84	452 ± 162	110 ± 23*	179 ± 33

(a) Os dados correspondem à média \pm desvio padrão de 5 animais/grupo avaliados na 6ª semana (subcrônico) e ao final da 13ª semana de tratamento (crônico).

(*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre a urinálise:

Apenas o tratamento com EH5 reduziu o volume da urina e a concentração de glicose excretada. Nos demais grupos ocorreu aumento nesses dois parâmetros após o tratamento crônico com o extrato. Os demais parâmetros mantiveram-se inalterados. (Tabela 3)

Tabela 3 - Urinálise de camundongos NOD tratados cronicamente com 5; 50 e 500mg/Kg do extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale*

URINÁLISE ^(a)					
Variáveis	Grupos	Tempo de tratamento			
		Inicial	1ª semana	6ª semana	13ª semana
Volume (mL)	Controle	1,1	1,3	1,5	0,7
	EH5	1,2	0,8	0,5	0,7
	EH500	1	1,3	1,6	1,4
Glicose (mg/dL)	Controle	500	500	500	500
	EH5	≥ 2000	500	500	-
	EH500	100	500	500	500
Proteína (mg/dL)	Controle	100	300	30	100
	EH5	100	100	100	30
	EH500	100	300	15	100

(a) As análises foram realizadas em pool de urina dos 5 animais de cada grupo.
 (-) abaixo do mínimo detectável

Avaliação do tratamento com EH sobre a concentração sérica de insulina:

A Figura 4 mostra que as duas doses EH5 e EH50 induziram um significativo aumento na concentração sérica de insulina após o tratamento subcrônico. Entretanto no tratamento Já após o tratamento crônico apenas o EH500 induziu alteração na concentração de insulina, reduzindo a mesma.

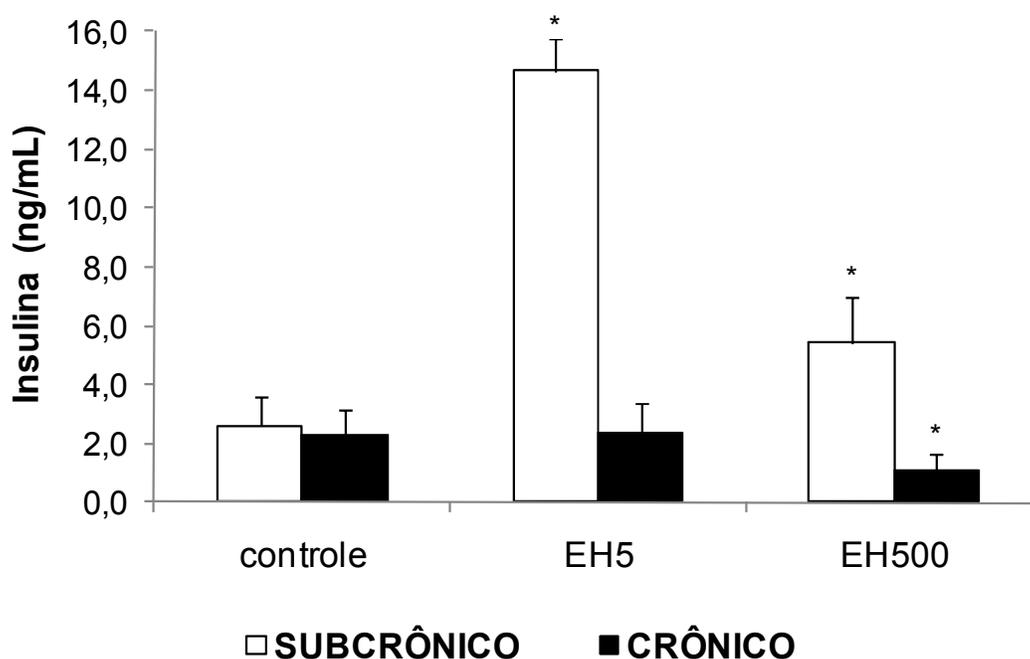


FIGURA 4: Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de flores de *A. occidentale* sobre a concentração sérica de insulina. Camundongos NOD receberam diariamente por 13 semanas EH nas doses, nas doses de 5 (EH5) e 500 (EH500) mg/Kg A concentração sérica de insulina foi determinada ao final da 6ª e 13ª semana. Os dados correspondem a média de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Avaliação do tratamento com EH sobre a concentração sérica de citocinas:

A figura 5 mostra que o tratamento com o extrato de *Anacardium occidentale* nas diferentes doses testadas não foi capaz de induzir alteração nas concentrações séricas de TNF- α e IFN- γ . Entretanto as concentrações séricas de IL10 e IL4 foram aumentadas pelo tratamento com EH5 e EH500, sendo a redução de IL-4 ocorreu de forma dose dependente.

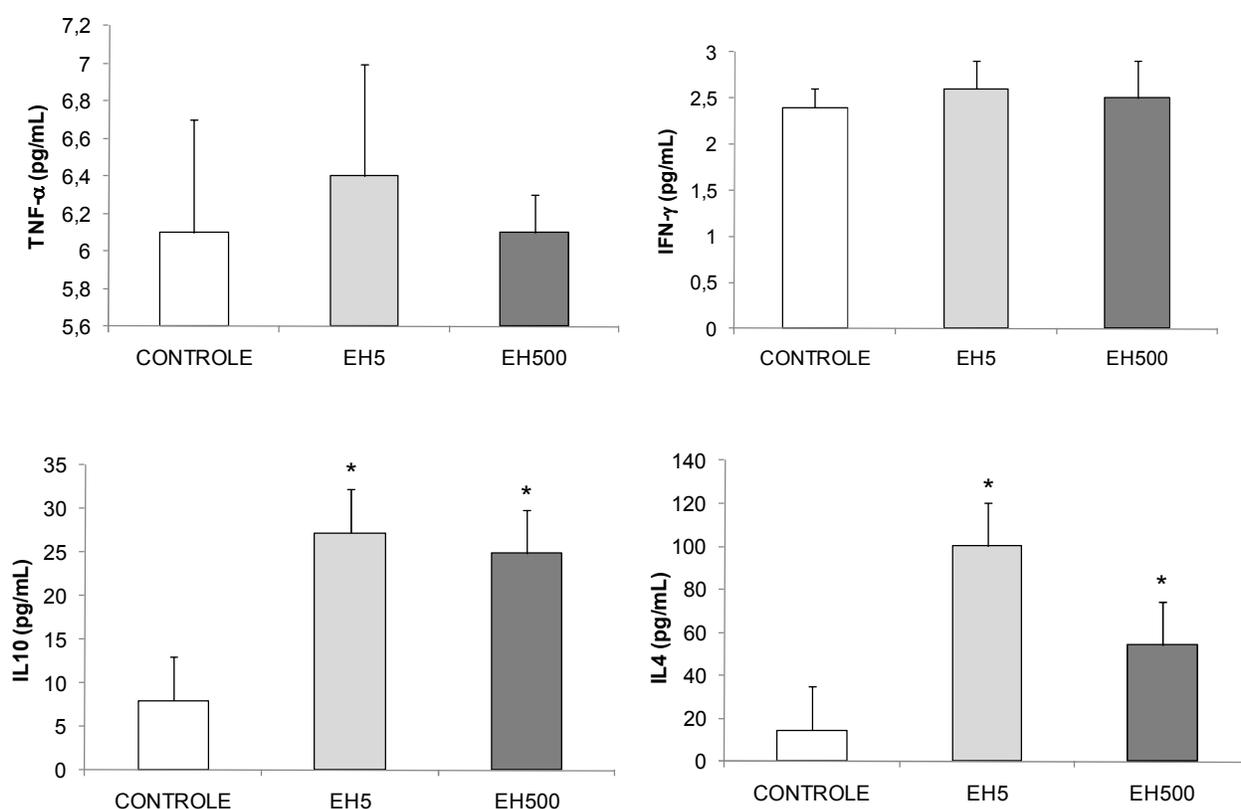


FIGURA 5: Efeito do tratamento com extrato hidroalcoólico de flores de *A. occidentale* sobre a concentração de IFN- γ ; TNF- α ; IL-4 e IL-10. Camundongos NOD receberam diariamente por 13 semanas EH nas doses de 5 (EH5), 50 (EH50) e 500 (EH500) mg/Kg. A concentração sérica de citocinas foi determinada ao 13^a semana. Os dados correspondem a média de 5 animais/grupo. (*) $p < 0,05$ na comparação com o controle.

Grau de relação existente entre as citocinas e demais variáveis:

As variáveis glicose sanguínea, hemoglobina glicosilada, colesterol total, volume de urina e glicose urinária correlacionaram-se negativamente com todas as citocinas, em contrapartida a insulina e proteína urinária correlacionaram-se positivamente as citocinas. As variáveis peso e consumo de ração correlacionaram-se apenas com IL10 de forma negativa, bem como os triglicérides ao TNF α . E a variável consumo de ração correlacionou-se com todas as citocinas negativamente, exceto ao TNF α (Tabela 4).

Tabela 4: Coeficiente de correlação linear de Pearson entre as citocinas e as variáveis peso, glicose sanguínea, hemoglobina glicosilada, triglicérides, colesterol total, insulina, consumo de água e ração, volume de urina, glicose e proteína urinária.

Variáveis	Citocinas ^a			
	IFN γ	TNF α	IL10	IL4
Peso	0	0	-1	0
Glicose sanguínea	-1	-1	-1	-1
Hemoglobina Glicosilada	-1	-1	-1	-1
Triglicérides	0	-1	0	0
Colesterol total	-1	-1	-1	-1
Insulina	1	1	1	1
Consumo de água	-1	0	-1	-1
Consumo de ração	0	0	-1	0
Volume de urina	-1	-1	-1	-1
Glicose urinária	-1	-1	-1	-1
Proteína urinária	1	1	0	1

(a) Os dados correspondem ao coeficiente de correlação linear de Pearson (r);

(r) r = 1 indica uma correlação linear positiva

r = -1 indica uma correlação linear negativa

r = 0 indica que não existe uma correlação linear entre as variáveis.

DISCUSSÃO

A diabetes é caracterizada fundamentalmente por alterações na concentração sanguínea de glicose o que afeta o funcionamento de vários órgãos (7, 45). Com base nessas informações verificamos o efeito de diferentes doses do extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale* na tolerância oral a glicose em camundongos NOD.

As alterações na tolerância à glicose que resultam num aumento do risco de doença cardiovascular e do desenvolvimento futuro de diabetes (40). A avaliação da tolerância a glicose auxilia a detecção precoce da sensibilidade a insulina (41). Os resultados mostram uma rápida ação do tratamento com EH5 na redução da glicemia dos animais. O efeito foi mais marcante 10 minutos após o tratamento com o extrato. Ao longo do tempo de avaliação esta redução foi modulada, de forma a proporcionar uma suave queda nos níveis sanguíneos de glicose, sem, no entanto causar hipoglicemia, nos intervalos subseqüentes.

O extrato EH5 apresentou acentuado efeito anti-hiperglicemiante semelhante aos observados em outros extratos vegetais e medicamentos utilizados para esta finalidade (12, 42, 43). Outro fato que chama a atenção no efeito desta dose é o seu curto tempo para ocorrer o efeito, sugerindo que no extrato existem compostos com essa ação anti-hiperglicemiante. Importante destacar que a dose efetiva foi relativamente baixa se levarmos em consideração os medicamentos comumente utilizados para esta finalidade (44).

Vários autores têm avaliado e descrito a redução dos níveis glicêmicos decorrente do tratamento com extratos obtidos das folhas e do caule de *Anacardium occidentale* na diabetes mellito (19-22), inclusive com o desenvolvimento e proteção de produtos com essa finalidade (46-48). Os resultados aqui obtidos no grupo EH5 (figura 2) corroboram, portanto, com esses trabalhos quanto a sua ação no controle e redução da glicose sanguínea. Sendo o extrato avaliado, obtido da mesma espécie vegetal, é razoável supor que nas partes áreas de *Anacardium occidentale* há composto(s) com ação no controle da diabetes.

Como a dose de efeito aqui descrita foi relativamente baixa, em comparação com o descrito para os extratos do caule e folha (19-22), podemos inferir que há nas flores uma maior concentração desse(s) composto(s).

Alterações no peso é um importante sinal da diabetes mellito (7). É comum ocorrer redução do peso corpóreo com a progressão e agravamento desta patologia (49). Ocorreu redução de peso apenas no grupo tratado com EH500, sugerindo que o EH5 não interfira neste parâmetro.

A Poliúria e a polidipsia são sinais comuns na diabetes mellito (5, 7). Em geral são decorrentes da elevação da glicemia, que ultrapassa o limiar da quantidade de glicose que os rins são capazes de reabsorver. A glicose é perdida na urina e, por osmolaridade, perde-se água, o que ocasiona a poliúria e a polidipsia compensatória. Assim medicamentos com ação sobre esses sinais também são efetivos em controlar a diabetes. O sucesso no seu tratamento passa pela redução desses sinais. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com EH5 e EH500 foi efetivo em reduzir controlar esses sinais por reduzir tanto o consumo de água quanto de ração (Tabela 1).

Em consequência da poliúria e da polidipsia ocorrem também alterações no volume e na composição da urina, por isso a urinálise é importante tanto no prognóstico como diagnóstico da diabetes. Além disso, a urinálise integra a rotina de acompanhamento dos pacientes diabéticos (53-55). A urinálise de animais tratados com as diferentes doses de EH mostra alterações pontuais na concentração de glicose e de proteína excretadas pela urina. Foi possível observar que o tratamento com EH5 reduziu esses dois parâmetros, indicando uma possível ação terapêutica do extrato (tabela 3). Essa avaliação foi prejudicada pelo pequeno volume de urina obtido, o que inviabilizou as avaliações individuais

Outro importante indicador usado no diagnóstico e acompanhamento da diabetes e a avaliação da hemoglobina glicada, considerada um sensível indicador do histórico glicêmico dos pacientes (7, 50). Os resultados obtidos mostram que somente o tratamento com EH5 reduziu o percentual de hemoglobina glicada, demonstrando que o extrato exerceu efeito crônico na redução dos níveis de sanguíneos de glicose.

O tratamento com EH5 reduziu a concentração de colesterol, mas não teve efeito sobre a concentração de triglicérides, mostrando mais uma vez que o extrato nessa concentração foi efetivo em controlar mais esse sinal associado à diabetes (Tabela 3). Em geral, o aumento da glicose interfere na mobilização e no metabolismo de gordura, por isso na diabetes geralmente ocorre aumento na concentração de colesterol. Desta forma, as opções de tratamento devem prevenir ou reduzir os níveis sanguíneos de colesterol (51, 52). Mais uma vez, os resultados obtidos reforçam a eficácia da menor concentração do extrato (EH5) no controle da diabetes.

Na busca de elucidarmos o possível mecanismo de ação do extrato avaliamos a concentração sérica de insulina e de citocinas nos animais submetidos ao tratamento.

Foi possível observar que enquanto a concentração de insulina se manteve inalterada no grupo controle, nos animais tratados com o extrato foi possível observar que o tratamento subcrônico com EH5 aumentou a concentração de insulina, mas esse aumento não se manteve após o tratamento crônico. Em relação aos outros grupos E50 e EH500, observamos que o tratamento subcrônico aumentou e o crônico reduziu a concentração de insulina. (Figura 4). A insulina é o hormônio responsável pelo transporte da glicose do meio extracelular para o intracelular sendo este o principal mecanismo de redução da concentração sanguínea de glicose do organismo (56). Com base nessas considerações é razoável supor a variação na concentração de glicose se manteve inalterada e estável nos grupos tratados com a maior e a menor dose (EH5 e EH500), já que os valores glicêmicos foram semelhantes aos obtidos em animais não diabéticos (dados não apresentados)

No cruzamento dos resultados observados na Figura 4, onde o EH5 foi efetivo no aumento da concentração sérica de insulina no tratamento subcronico com a redução glicêmica evidenciada no início do tratamento, pode-se supor que a redução glicêmica observada no início do tratamento, bem como os efeitos benéficos no tratamento da diabetes evidenciados por meio de outros parâmetros avaliados, principalmente no grupo EH5, deve-se a uma possível ação estimulante da secreção

de insulina, uma vez que apenas este grupo apresentou significativa melhora em vários parâmetros indicadores de diabetes, concomitantemente, a uma elevada concentração sérica de insulina. Como observamos uma alta concentração sérica de insulina no grupo EH5, supõe-se que no extrato existam compostos capazes de estimular a secreção de insulina.

A diabetes mellito em camundongos NOD decorre da produção insuficiente de insulina devido à destruição, por mecanismo auto-imune, das células β pancreáticas (57). Em geral essa resposta inflamatória é intensificada pela produção de citocinas inflamatórias como IL-6, INF- γ e TNF- α . Há, portanto, correlação positiva entre a produção de citocinas e o desenvolvimento da diabetes em camundongos NOD. Assim, a insulite destrutiva das células β está associada ao aumento de TNF- α e INF- γ , enquanto a insulite não destrutiva ou benigna está associada com ao aumento da expressão de IL4 (39).

Como o extrato não induziu alterações na concentração sérica nem de INF- γ nem de TNF- α , supõe-se que o tratamento pode ter apresentado efeitos no controle da diabetes por também regular a produção de citocinas inflamatórias. Contribui com essa suposição o fato do mesmo tratamento ocasionou significativos aumentos tanto na produção de IL-4 como de IL-10. Essas citocinas podem regular e reduzir o processo inflamatório no pâncreas, ocasionando apenas uma insulite não destrutiva das células β .

Avaliou-se também o grau de relação existente entre as citocinas e demais variáveis, por meio do coeficiente de correlação linear de Pearson.

As variáveis glicose sanguínea, hemoglobina glicosilada e colesterol total, volume de urina e glicose urinária, correlacionaram-se negativamente com todas as citocinas, ou seja, quando a concentração sérica de citocinas aumenta a concentração destas variáveis diminui e vice-versa (Tabela 4). Como observamos um aumento na concentração das citocinas IL10 e IL4 no tratamento com EH5 concomitantemente a uma redução na concentração sérica de glicose sanguínea, hemoglobina glicosilada, volume de urina e glicose urinária, podemos supor que o

aumento induzido por EH5 nas citocinas IL10 e IL4 contribuiu para redução dos níveis destas variáveis.

As citocinas IL10 e IL4 também correlacionaram-se positivamente com a concentração sérica de insulina (Tabela 4). Como observamos no grupo EH5 um aumento na expressão destas citocinas concomitantemente a um aumento na concentração sérica de insulina, podemos supor um possível efeito modulador da IL10 e IL4 sobre a concentração sérica de insulina, induzindo neste ensaio um aumento na mesma.

Estes resultados corroboram aos observados em outros estudos, onde o aumento da expressão de IL10 e IL4 foi considerado como fator protetor no desenvolvimento da diabetes auto-imune, desempenhando importante papel imunomodulador, reduzindo a insulite, a destruição das células β pancreáticas, os efeitos sobre a produção de insulina e os efeitos patológicos da diabetes, conseqüentemente retardando o surgimento dos sinais da diabetes. (58-62)

Com base nestas informações podemos supor que o possível mecanismo de ação do EH5 seja o de modulação da concentração sérica de IL10 e IL4 que por sua vez modularia a concentração sérica de insulina por meio de seu efeito imunomodulador sobre as células β e conseqüentemente sobre a produção de insulina. E a insulina sendo o principal hormônio hipoglicemiante do organismo desencadearia todos os efeitos benéficos observados no tratamento da diabetes com EH5.

CONCLUSÕES

O extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale L.*, na menor dose (5mg/Kg), induziu efeito benéfico na diabetes mellito, reduzindo e modulando a glicose sanguínea após tratamento agudo e crônico, bem como nos sinais decorrentes da diabetes. É provável que o mecanismo de ação do extrato esteja relacionado a modulação do processo auto-imune por meio da produção de IL-4 e IL-10 sobre as células β e produção de insulina, entretanto são necessários estudos

ainda mais detalhados sobre o efeito observado, bem como para o estabelecimento da segurança no consumo do extrato.

REFERÊNCIAS

1. Tfayli H, Arslanian S: **Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in youth: the evolving chameleon.** Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009, **53**(2):165-174.
2. Surampudi PN, John-Kalarickal J, Fonseca VA: **Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus.** Mt Sinai J Med. 2009, **76**(3):216-226.
3. Pang TT, Narendran P: **Addressing insulin resistance in Type 1 diabetes.** Diabet Med. 2008, **25**(9):1015-1024.
4. Bougneres P, Valleron AJ: **Causes of early-onset type 1 diabetes: toward data-driven environmental approaches.** J Exp Med. 2008, **205**(13):2953-2957.
5. Briede J, Stivrina M, Stoldere D, Vigante B, Duburs G: **Effect of cerebrocrast on body and organ weights, food and water intake, and urine output of normal rats.** Cell Biochem Funct. 2008, **26**(8):908-915.
6. Mumtaz S, Ashfaq T, Siddiqui H: **Knowledge of medical students regarding diabetes mellitus at Ziauddin University, Karachi.** J Pak Med Assoc. 2009, **59**(3):163 -166.
7. World Health Organization IDF: **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation.** Geneva; 2006
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: **Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.** Diabetes Care 2004, **27**(5): 1047-1053.
9. Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, et al: **The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000.** Diabetes Care 2005, **28**(9):2130-2135.
10. **Prevalence of diabetes worldwide 2009**
[http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/]

11. **Prevalence of diabetes in the WHO Region of the Americas** [http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html]
12. Samad A, Shams MS, Ullah Z, Wais M, Nazish I, Sultana Y, et al: **Status of herbal medicines in the treatment of diabetes: a review.** *Curr Diabetes Rev.* 2009, **5**(2):102-111.
13. Gupta S, Sharma SB, Bansal SK, Prabhu KM: **Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes.** *J Ethnopharmacol* 2009, **123**(3): 499-503.
14. Pandikumar P, Babu NP, Ignacimuthu S: **Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam. in normal and streptozotocin induced diabetic rats.** *J Ethnopharmacol* 2009, **124**(1): 111-115.
15. Comelli F, Bettoni I, Colleoni M, Giagnoni G, Costa B: **Beneficial effects of a *Cannabis sativa* extract treatment on diabetes-induced neuropathy and oxidative stress.** *Phytother Res.* 2009, **23**(12): 1678-1684.
16. Naowaboot J, Pannangpetch P, Kukongviriyapan V, Kongyingyoes B, Kukongviriyapan U: **Antihyperglycemic, Antioxidant and Antiglycation Activities of Mulberry Leaf Extract in Streptozotocin-Induced Chronic Diabetic Rats.** *Plant Foods Hum Nutr.* 2009, **64**(2): 116-121.
17. Bhat M, Kothiwale SK, Tirmale AR, Bhargava SY, Joshi BN: **Antidiabetic Properties of *Azadiracta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: In Vivo Studies in Murine Diabetes Model.** *Evid Based Complement Alternat Med.* 2009, doi:10.1093/ecam/nep033.
18. Deuschlander MS, van de Venter M, Roux S, Louw J, Lall N: **Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes.** *J Ethnopharmacol.* 2009, **124**(3): 619-624.
19. Kamtchouing P, Sokeng SD, Moundipa PF, Watcho P, Jatsa HB, Lontsi D: **Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats.** *J Ethnopharmacol.* 1998, **62**(2):95-99.
20. Alexander-Lindo RL, Morrison EY, Nair MG: **Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of *Anacardium occidentale* (cashew).** *Phytother Res.* 2004, **18**(5):403-407.

21. Ojewole JA: **Laboratory evaluation of the hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2003, **25**(3):199-204.
22. Tedong L, Dimo T, Dzeufiet PDD, Asongalem AE, Sokeng DS, Callard P, et al.: **Antihyperglycemic and renal protective activities of *Anacardium occidentale* (anacardiaceae) leaves in streptozotocin induced diabetic rats.** *Afr J Trad.* 2006, **3**: 23-35.
23. Lorenzi HM, JA: *Plantas Medicinais do Brasil: nativas, exóticas e cultivadas.* Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium; 2002.
24. Albuquerque J: *Plantas Medicinais de uso popular.* Brasília; 1989.
25. Cruz G: *Dicionário de Plantas úteis do Brasil.* Rio de Janeiro: Ed. Civilização Brasileira; 1985.
26. Olajide OA, Aderogba MA, Adedapo AD, Makinde JM: **Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models.** *J Ethnopharmacol.* 2004, **95**(2-3):139-142.
27. Menezes EA, Tome ER, Nunes RN, Nunes AP, Freire CC, Torres JC, et al.: **Extracts of *Anacardium occidentale* (cashew) pollen in patients with allergic bronchial asthma.** *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2002, **12**(1): 25-28.
28. Akinpelu DA: **Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark.** *Fitoterapia.* 2001, **72**(3): 286-287.
29. Araújo C: **Atividade antifúngica in vitro da casca do *Anacardium occidentale* L. sobre o gênero *Candida*.** *Arq Odontol.* 2005, **41**: 263.
30. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS** [<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>]
31. Marles RJ, Farnsworth NR: **Antidiabetic plants and their active constituents.** *Phytomedicine.* 1995, **2**: 137-189.
32. Atkinson MA, Eisenbarth GS: **Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment.** *Lancet.* 2001, **358**(9277): 221-229.

33. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G: **Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group.** Diabetes Care. 1999, **22**(10): 1698-1702.
34. Homo-Delarche F: **Beta-cell behaviour during the prediabetic stage. Part II. Non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetes mellitus.** Diabetes & metabolism. 1997, **23**(6): 473-505.
35. Todd JA, Wicker LS: **Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models.** Immunity. 2001, **15**(3): 387-395.
36. Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA: **Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice.** Diabetes. 1994, **43**(5): 667-675.
37. Jansen A, Rosmalen JG, Homo-Delarche F, Dardenne M, Drexhage HA: **Effect of prophylactic insulin treatment on the number of ER-MP23+ macrophages in the pancreas of NOD mice. Is the prevention of diabetes based on beta-cell rest?** Journal of autoimmunity. 1996, **9**(3): 341-348.
38. Rosmalen JG, Leenen PJ, Pelegri C, Drexhage HA, Homo-Delarche F: **Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes.** Trends Endocrinol Metab. 2002, **13**(5): 209-214.
39. A R: **An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus.** Diabetes Metab Rev. 1998, **14**(2): 129-151.
40. Roman G, Hancu N: **Early insulin treatment to prevent cardiovascular disease in prediabetes and overt diabetes.** Horm Metab Res. 2009, **41**(2): 116-122.
41. Wopereis S, Rubingh CM, van Erk MJ, Verheij ER, van Vliet T, Cnubben NH, et al.: **Metabolic profiling of the response to an oral glucose tolerance test detects subtle metabolic changes.** PLoS ONE. 2009, **4**(2): e4525.
42. Fuentes O, Arancibia-Avila P, Alarcon J: **Hypoglycemic activity of Bauhinia candicans in diabetic induced rabbits.** Fitoterapia. 2004, **75**(6): 527-532.

43. Giuseppina N: **Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2005, **41**(2): 121-142.
44. Raskin P, Lewin A, Reinhardt R, Lyness W: **Twice-daily dosing of a repaglinide/metformin fixed-dose combination tablet provides glycaemic control comparable to rosiglitazone/metformin tablet.** Diabetes Obes Metab. 2009, **11**(9): 865-873.
45. **Fact sheet: diabetes 2008**
[<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>]
46. Gbodossou E, Vidjin A, inventors; Medicinal plant extracts used in the treatment of diabetic diseases. France. 2002.
47. Ratsimamanga S, inventor Extrait végétal à propriétés antidiabétiques et son procédé de préparation. France patent 2465484. 1981.
48. Corrie M, inventor Therapeutic Compositions. England patent 1281526. 1972.
49. Berry D: **Review: weight-reducing agents improve glycaemic control and reduce progression to diabetes.** Evid Based Nurs. 2009, **12**(2): 45.
50. Motta M, Bennati E, Cardillo E, Ferlito L, Malaguarnera M: **The value of glycosylated hemoglobin (HbA1c) as a predictive risk factor in the diagnosis of diabetes mellitus (DM) in the elderly.** Arch Gerontol Geriatr. 2009, **50**(1): 60-64.
51. Mooradian AD: **Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus.** Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2009, **5**(3): 150-159.
52. Tovar JM, Bazaldua OV, Loffredo A: **Diabetic dyslipidemia: a practical guide to therapy.** J Fam Pract. 2008, **57**(6): 377-388.
53. Jeha GS, Haymond M: **Understanding and interpreting laboratory test results in the clinical management of diabetes mellitus.** Pediatr Endocrinol Rev. 2007; **5**(1): 608-628.
54. Urakami T, Morimoto S, Nitadori Y, Harada K, Owada M, Kitagawa T: **Urine glucose screening program at schools in Japan to detect children with diabetes and its outcome-incidence and clinical characteristics of childhood type 2 diabetes in Japan.** Pediatr Res. 2007, **61**(2): 141-145.

55. Tahirovic H, Toromanovic A, Feukic A, Ostrvica D: **Clinical and laboratory characteristics at onset of type 1 diabetes mellitus in children.** Lijec Vjesn. 2007, **129**(3-4): 61-65.
56. Muretta JM, Mastick CC: **How insulin regulates glucose transport in adipocytes.** Vitam Horm. 2009, **80**: 245-86.
57. Homo-Delarche F: **Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune disease in the nonobese diabetic (NOD) mouse.** Ilar J. 2004, **45**(3): 237-258.
58. Calcinaro F, Gambelungho G, Lafferty KJ: **Protection from autoimmune diabetes by adjuvant therapy in the non-obese diabetic mouse: the role of interleukin-4 and interleukin-10.** Immunol Cell Biol. 1997, **75**(5):467-471.
59. Lee M, Ko KS, Oh S, Kim SW: **Prevention of autoimmune insulinitis by delivery of a chimeric plasmid encoding interleukin-4 and interleukin-10.** J Control Release. 2003, **88**(2):333-342.
60. Balasa B, Sarvetnick N: **Cytokines and IDDM: implications for etiology and therapy.** Drug News Perspect. 1998, **11**(6):356-360.
61. Rehman KK, Trucco M, Wang Z, Xiao X, Robbins PD. **AAV8-mediated gene transfer of interleukin-4 to endogenous beta-cells prevents the onset of diabetes in NOD mice.** Mol Ther. 2008, **16**(8):1409-1416.
62. Goudy KS, Burkhardt BR, Wasserfall C, Song S, Campbell-Thompson ML, Brusko T, Powers MA, Clare-Salzler MJ, Sobel ES, Ellis TM, Flotte TR, Atkinson MA: **Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion.** J Immunol. 2003, **171**(5):2270-2278.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentre as doses avaliadas, o extrato hidroalcoólico das flores de *Anacardium occidentale L.*, apenas induziu efeito benéfico na diabetes mellito, na menor dose (5mg/Kg). Estes efeitos consistiram na redução e modulação da glicose sanguínea após tratamento agudo e crônico, bem como de sinais característicos da diabetes, como polifagia, polidipsia, poliúria, glicosúria dentre outros.

Após o cruzamento de informações sobre o efeito da dose de 5 mg/Kg sobre a concentração sérica de insulina e citocinas, chegou-se a suposição que o provável que o mecanismo de ação da dose esteja relacionado a modulação do processo auto-imune por meio da produção de IL-4 e IL-10 sobre as células β e produção de insulina, entretanto são necessários estudos ainda mais detalhados sobre o efeito observado, bem como para o estabelecimento da segurança no consumo do extrato.

REFERENCIAS

- ADA – TECDICDM, 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.
- Akinpelu, D. A. Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark. Fitoterapia, v.72, n.3, Mar, p.286-7. 2001.
- Albuquerque, J. Plantas Mediciniais de uso popular. Brasília. 1989
- Alexander-Lindo, R. L., E. Y. Morrison, *et al.* Hypoglycaemic effect of stigmast-4-en-3-one and its corresponding alcohol from the bark of Anacardium occidentale (cashew). Phytother Res, v.18, n.5,p.403-7. 2004.
- Araújo, C. e E. Al. Atividade antifúngica in vitro da casca do Anacardium occidentale L. sobre o gênero Candida. Arq Odontol, v.41, p.263. 2005.
- Atkinson, M. A. e G. S. Eisenbarth. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet, v.358, n.9277, p.221-9. 2001.
- Barker, D. J. In utero programming of chronic disease. Clin Sci, v.95, n.2, p.115-28. 1998.
- Berne, R. M. G., S. M. . Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000
- Berry, D. Review: weight-reducing agents improve glycaemic control and reduce progression to diabetes. Evid Based Nurs, v.12, n.2, p.45. 2009.
- Beyan, H., L. R. Buckley, *et al.* A role for innate immunity in type 1 diabetes? Diabetes Metab Res Rev, v.19, n.2, p.89-100. 2003.
- Chang, C. L., H. K. Kuo, *et al.* The distinct effects of a butanol fraction of Bidens pilosa plant extract on the development of Th1-mediated diabetes and Th2-mediated airway inflammation in mice. J Biomed Sci, v.12, n.1, p.79-89. 2005.
- Cruz, G. Dicionário de Plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ed. Civilização Brasileira. 1985
- Dahlquist, G. G., C. Patterson, *et al.* Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. Diabetes Care, v.22, n.10, p.1698-702. 1999.
- Dandonna, P., A. Aljada, *et al.* The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab, v.88, n.6, p.2422-9. 2003.
- Delovitch, T. L. e B. Singh. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. Immunity, v.7, n.6, p.727-38. 1997.

Fernandez-Real, J. M. e W. Ricart. Insulin resistance and inflammation in an evolutionary perspective: the contribution of cytokine genotype/phenotype to thriftiness. Diabetologia, v.42, n.11, p.1367-74. 1999.

Fujita, N., I. Sakaguchi, *et al.* An extract of the root of *Lithospermum erythrorhizon* accelerates wound healing in diabetic mice. Biol Pharm Bull, v.26, n.3, p.329-35. 2003.

Gbodossou, E. e A. Vidjin. Medicinal plant extracts used in the treatment of diabetic diseases. Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle. France: 24 p. 2002.

Giuseppina, N. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.41, n.2, p.121-142. 2005.

Gross, J. L., S. Silveiro, *et al.* Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. Arg Bras Endocrinol Metabol, v.46 n.1, p.16-26. 2002.

Hattersley, A. T. e J. E. Tooke. The fetal insulin hypothesis: an alternative explanation of the association of low birthweight with diabetes and vascular disease. Lancet, v.353, n.9166, p.1789-92. 1999.

Homo-Delarche, F. Beta-cell behaviour during the prediabetic stage. Part II. Non-insulin-dependent and insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes Metab, v.23, n.6, p.473-505. 1997.

_____. Neuroendocrine immuno-ontogeny of the pathogenesis of autoimmune disease in the nonobese diabetic (NOD) mouse. Ilar J, v.45, n.3, p.237-58. 2004.

Hou, C. C., S. J. Lin, *et al.* Antidiabetic dimeric guianolides and a lignan glycoside from *Lactuca indica*. J Nat Prod, v.66, n.5, p.625-9. 2003.

Jansen, A., F. Homo-Delarche, *et al.* Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. Diabetes, v.43, n.5, p.667-75. 1994.

Jansen, A., J. G. Rosmalen, *et al.* Effect of prophylactic insulin treatment on the number of ER-MP23+ macrophages in the pancreas of NOD mice. Is the prevention of diabetes based on beta-cell rest? J Autoimmun, v.9, n.3, p.341-8. 1996.

Kamtchouing, P., S. D. Sokeng, *et al.* Protective role of *Anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. J Ethnopharmacol, v.62, n.2, p.95-9. 1998.

Konan, N. A. e E. M. Bacchi. Antiulcerogenic effect and acute toxicity of a hydroethanolic extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) leaves. J Ethnopharmacol, v.112, n.2, p.237-42. 2007.

Konan, N. A., E. M. Bacchi, *et al.* Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). J Ethnopharmacol, v.110, n.1, p.30-8. 2007.

Leslie, R. D., R. Taylor, *et al.* The role of insulin resistance in the natural history of type 1 diabetes. Diabet Med, v.14, n.4, p.327-31. 1997.

Li, W. L., H. C. Zheng, *et al.* Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. J. Ethnopharmacol., v.92, p.1-21. 2004.

Lorenzi, H. M., Ja. Plantas Medicinais do Brasil: nativas, exóticas e cultivadas. . Nova Odessa, SP: Instituto Plantarium. 2002

Marles, R. J. e N. R. Farnsworth. Antidiabetic plants and their active constituents. Phytomedicine, v.2, p.137-189. 1995.

Menezes, E. A., E. R. Tome, *et al.* Extracts of *Anacardium occidentale* (cashew) pollen in patients with allergic bronchial asthma. J Investig Allergol Clin Immunol, v.12, n.1, p.25-8. 2002.

MS, Ministério da Saúde do Brasil. RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Brasília: Ministério da Saúde. 2009.

MS, Ministério da Saúde do Brasil. O que é RENISUS. Brasília: Ministério da Saúde. 2010.

Nogueira, L. Mais conforto e eficiência. Pesquisa FAPESP – Ciência e Tecnologia no Brasil, v.89, p.78-79. 2003.

Ojewole, J. A. Laboratory evaluation of the hypoglycemic effect of *Anacardium occidentale* Linn (Anacardiaceae) stem-bark extracts in rats. Methods Find Exp Clin Pharmacol, v.25, n.3, p.199-204. 2003.

Olajide, O. A., M. A. Aderogba, *et al.* Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. J Ethnopharmacol, v.95, n.2-3, p.139-42. 2004.

WHO, World Health Organization. Fact sheet: diabetes Geneva. 2009 2008.

_____. Prevalence of diabetes in the WHO Region of the Americas. Geneva. 2009

2009

Petlevski, R., M. Hadzija, *et al.* Effect of 'antidiabetic' herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. J Ethnopharmacol, v.75, n.2-3, p.181-4. 2001.

Pickup, J. C., M. B. Mattock, *et al.* NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. Diabetologia, v.40, n.11, p.1286-92. 1997.

Roglic, G., N. Unwin, *et al.* The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. Diabetes Care, v.28, n.9, p.2130-5. 2005.

Rosmalen, J. G., P. J. Leenen, *et al.* Islet abnormalities in the pathogenesis of autoimmune diabetes. Trends Endocrinol Metab, v.13, n.5, p.209-14. 2002.

Said, O., K. Khalil, *et al.* Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank region. J Ethnopharmacol, v.83, n.3, p.251-65. 2002.

Samad, A., M. S. Shams, *et al.* Status of herbal medicines in the treatment of diabetes: a review. Curr Diabetes Rev, v.5, n.2, p.102-11. 2009.

Saravia, F. e F. Homo-Delarche. Is innervation an early target in autoimmune diabetes? Trends Immunol, v.24, n.11, p.574-9. 2003.

Silva, C., A. Ribeiro, *et al.* Administração oral de peptídeos e proteínas III. Aplicação à insulina. Rev. Bras. Cienc. Farm., v.39, p.21-40. 2003.

Tedong, L., T. Dimo, *et al.* Antihyperglycemic and renal protective activities of *Anacardium occidentale* (anacardiaceae) leaves in streptozotocin induced diabetic rats. Afr. J. Trad., v.3, p.23-35. 2006.

Todd, J. A. e L. S. Wicker. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. Immunity, v.15, n.3, p.387-95. 2001.

Volpato, G. T., D. C. Damasceno, *et al.* Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. Rev. Bras. Pl. Med., v.4, p.35-45. 2002.

West, M. E. e V. G. Box. The antiarrhythmic property of myoinositol isolated from the bark of Jamaican *anacardium occidentale* (cashew). West Indian med. j, v.21, n.3, p.165. 1972.

West, M. E., H. L. Garvey, *et al.* Cardiovascular and antiarrhythmic effects of an active principle from the bark of *anacardium* West Indian med. j, v.22, n.2, p.49-59. 1973.

Wild, S., G. Roglic, *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care, v.27, n.5, p.1047-53. 2004.

World Health Organization, I. D. F. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: 2006, p.50. 2006.

ANEXO A

Normas para submissão de artigo a BMC Complementary and Alternative Medicine

Instructions for BMC Complementary and Alternative Medicine authors

[General information](#)

[Preparing main manuscript text](#)

[Preparing illustrations and figures](#)

[Preparing tables](#)

[Preparing additional files](#)

[Style and language](#)

General information

You are advised also to read [About this journal](#), which includes other relevant information.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *BMC Complementary and Alternative Medicine* accepts only [online submission](#). The submission process is compatible with version 3.0 or later of Internet Explorer and Netscape Navigator, and with most other modern web browsers. It can be used from PC, Mac, or Unix platforms.

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time - when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of acceptable word processor and graphics file formats. Additional files of any type, such as movies, animations, or original data files, can also be submitted as part of the publication.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Please use this to explain why your manuscript should be published in the journal and to elaborate on any issues relating to our editorial policies detailed in the instructions for authors.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from the customer support team (info@biomedcentral.com).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors, on our [Tools for Authors](#) page.

Publication and peer review processes

Submitted manuscripts will be sent to peer reviewers, unless they are either out of scope or below threshold for the journal, or the presentation or written English is of an unacceptably low standard. They will generally be reviewed by two experts with the aim of reaching a first decision as soon as possible. Statistical reviewers are also used where required (for a full list of our statistical advisers, please [click here](#)). Reviewers are asked to declare any competing interests and have to agree to open peer review, which works on two levels: the authors receive the signed report and, if the manuscript is published, the same report is available to the readers. The pre-publication history (initial submission, reviews and revisions - see, for example, [pre-publication history](#)) is posted on the web with the published article.

Reviewers are asked whether the manuscript is scientifically sound and coherent, how interesting it is and whether the quality of the writing is acceptable. Where possible, the final decision is made on the basis that the peer reviewers are in accordance with one another, or that at least there is no strong dissenting view. In cases where there is strong disagreement either among peer reviewers or between the authors and peer reviewers, advice is sought from a member of the journal's Editorial Board. The journal allows a maximum of two revisions of any manuscript. All appeals should be directed to the Medical Editor. The ultimate responsibility for editorial decisions lies with the Editor-in-Chief.

Reviewers are also asked to indicate which articles they consider to be especially interesting or significant. These articles may be given greater prominence and greater external publicity, and the authors may be asked if they would prefer to have the manuscript published in *BMC Medicine*

Once an article is accepted, it is published in BMC Complementary and Alternative Medicine immediately as a provisional PDF file. The paper will subsequently be published in both fully browseable web form, and as a formatted PDF. The article will then be available through BMC Complementary and Alternative Medicine, BioMed Central and PubMed Central, and will also be included in PubMed.

Authors will be able to check the progress of their paper through the submission system at any time by logging into [My BioMed Central](#), their personalized section of the site.

Article-processing charges

BMC Complementary and Alternative Medicine levies an article-processing charge for every accepted article, to cover the costs incurred by open access publication. In 2010 the article-processing charge is £1125/US\$1835/€1285. Generally, if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article processing charge is covered by the membership, and no further charge is payable. In the case of authors whose institutions are [supporter members](#) of BioMed Central, however, a discounted article processing charge is payable by the author. Please [click here](#) to check if your institution is a BioMed Central member. We routinely waive charges for authors from low-income countries. For further details, see [more information about article-processing charges](#).

Editorial policies

Any manuscripts, or substantial parts of it, submitted to the journal must not be under consideration by any

other journal. In general, the manuscript should not have already been published in any journal or other citable form, although it may have been deposited on a preprint server. The journal is willing to consider peer-reviewing manuscripts that are translations of articles originally published in another language. In this case, the consent of the journal in which the article was originally published must be obtained and the fact that the article has already been published must be made clear on submission and stated in the abstract. Further information on duplicate/overlapping publications can be found [here](#). Authors are required to ensure that no material submitted as part of a manuscript infringes existing copyrights, or the rights of a third party. Authors who publish in BMC Complementary and Alternative Medicine retain copyright to their work ([more information](#)). Correspondence concerning articles published in BMC Complementary and Alternative Medicine is encouraged through the [online comment system](#).

Submission of a manuscript to BMC Complementary and Alternative Medicine implies that all authors have read and agreed to its content, and that any experimental research that is reported in the manuscript has been performed with the approval of an appropriate ethics committee. Research carried out on humans must be in compliance with the [Helsinki Declaration](#), and any experimental research on animals must follow internationally recognized guidelines. A statement to this effect must appear in the Methods section of the manuscript, including the name of the body which gave approval, with a reference number where appropriate. Informed consent must also be documented. Manuscripts may be rejected if the editorial office considers that the research has not been carried out within an ethical framework, e.g. if the severity of the experimental procedure is not justified by the value of the knowledge gained.

BMC Complementary and Alternative Medicine's publisher, BioMed Central, has a legal responsibility to ensure that its journals do not publish material that infringes copyright, or that includes libellous or defamatory content. If, on review, your manuscript is perceived to contain potentially libellous content the journal Editors, with assistance from the publisher if required, will work with authors to ensure an appropriate outcome is reached.

Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses in the Methods section.

We ask authors of BMC Complementary and Alternative Medicine papers to complete a [declaration of competing interests](#), which should be provided as a separate section of the manuscript, to follow the Acknowledgements. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'. Much has been written about competing interests (or conflict of interest, as other journals call it) within scientific research, but the following articles provide some background:

[R Smith: Beyond conflict of interest. BMJ 1998, 317 :291-292](#)

[R Smith: Making progress with competing interests. BMJ 2002, 325 :1375-1376](#)

[CD DeAngelis, PB Fontanarosa, A Flanagan: Reporting financial conflicts of interest and relationships between investigators and research sponsors. JAMA 2001, 286 :89-9](#)

[K Morin, H Rakatansky, FA Riddick Jr, LJ Morse, JM O'Bannon 3rd, MS Goldrich, P Ray, M Weiss, RM Sade, MA Spillman: Managing conflicts of interest in the conduct of clinical trials. JAMA 2002, 287 :78-84](#)

For all articles that include information or clinical photographs relating to individual patients, written and signed consent from each patient to publish must also be mailed or faxed to the editorial staff. The manuscript should also include a statement to this effect in the Acknowledgements section, as follows: "Written consent for publication was obtained from the patient or their relative."

BMC Complementary and Alternative Medicine supports initiatives to improve the performance and reporting of clinical trials, part of which includes prospective registering and numbering of trials. The [International Committee of Medical Journal Editors](#) (ICMJE) defines a clinical trial as any research study that prospectively assigns human subjects to one or more health related interventions to evaluate the

effects on health outcomes. Authors of protocols or reports of such clinical trials, where the primary purpose of the research is to understand the causes, development and effects of disease, or to improve preventative, diagnostic or therapeutic interventions, must register their trial prior to submission in a suitable publicly accessible registry. Registries which meet the requirements of the ICMJE include WHO Primary Registries. The trial registration number should be included as the last line of the abstract of the manuscript.

BMC Complementary and Alternative Medicine also supports initiatives aimed at improving the reporting of biomedical research. Checklists have been developed for a number of study designs, including randomized controlled trials (CONSORT), systematic reviews (PRISMA), meta-analyses of observational studies (MOOSE), diagnostic accuracy studies (STARD) and qualitative studies (RATS). We recommend authors refer to the EQUATOR network website for further information on the available reporting guidelines for health research, and the MIBBI Portal for prescriptive checklists for reporting biological and biomedical research where applicable. Authors are requested to make use of these when drafting their manuscript and peer reviewers will also be asked to refer to these checklists when evaluating these studies. For authors of systematic reviews, a supplementary file, linked from the Methods section, should reproduce all details concerning the search strategy. For an example of how a search strategy should be presented, see the Cochrane Reviewers' Handbook.

Authors from pharmaceutical companies, or other commercial organizations that sponsor clinical trials, should adhere to the Good Publication Practice guidelines for pharmaceutical companies, which are designed to ensure that publications are produced in a responsible and ethical manner. The guidelines also apply to any companies or individuals that work on industry-sponsored publications, such as freelance writers, contract research organizations and communications companies.

The involvement of medical writers or anyone else who assisted with the preparation of the manuscript content should be acknowledged, along with their source of funding, as described in the European Medical Writers Association (EMWA) guidelines on the role of medical writers in developing peer-reviewed publications. If medical writers are not listed among the authors, it is important that their role be acknowledged explicitly. We suggest wording such as 'We thank Jane Doe who provided medical writing services on behalf of XYZ Pharmaceuticals Ltd.'

Any 'in press' articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Submission of a manuscript to *BMC Complementary and Alternative Medicine* implies that readily reproducible materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any scientist wishing to use them for non-commercial purposes. Nucleic acid sequences, protein sequences, and atomic coordinates should be deposited in an appropriate database in time for the accession number to be included in the published article. In computational studies where the sequence information is unacceptable for inclusion in databases because of lack of experimental validation, the sequences must be published as an additional file with the article.

Nucleotide sequences

Nucleotide sequences can be deposited with the [DNA Data Bank of Japan \(DDBJ\)](#), [European Molecular Biology Laboratory \(EMBL/EBI\) Nucleotide Sequence Database](#), or [GenBank](#) (National Center for Biotechnology Information).

Protein sequences

Protein sequences can be deposited with [SwissProt](#) or the [Protein Information Resource](#) (PIR).

Structures

Protein structures can be deposited with one of the members of the [Worldwide Protein Data Bank](#). Nucleic Acids structures can be deposited with the [Nucleic Acid Database](#) at Rutgers. Crystal structures of organic compounds can be deposited with the [Cambridge Crystallographic Data Centre](#).

Chemical structures and assays

Structures of chemical substances can be deposited with [PubChem Substance](#). Bioactivity screens of chemical substances can be deposited with [PubChem BioAssay](#).

Microarray data

Where appropriate, authors should adhere to the standards proposed by the [Microarray Gene Expression Data Society](#) and must deposit microarray data in one of the public repositories, such as [ArrayExpress](#), [Gene Expression Omnibus \(GEO\)](#) or the [Center for Information Biology Gene Expression Database \(CIBEX\)](#).

Computational modeling

We encourage authors to prepare models of biochemical reaction networks using the [Systems Biology Markup Language](#) and to deposit the model with the [BioModels database](#), as well as submitting it as an additional file with the manuscript.

Plasmids

We encourage authors to deposit copies of their plasmids as DNA or bacterial stocks with [Addgene](#), a non-profit repository, or [PlasmID](#), the Plasmid Information Database at Harvard.

BioMed Central is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). Authors who have appealed against a rejection but remain concerned about the editorial process can refer their case to COPE. For more information, visit www.publicationethics.org.

BioMed Central endorses the World Association of Medical Editors (WAME) [Policy](#)

Statement on Geopolitical Intrusion on Editorial Decisions.

Preparing main manuscript text

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft Word (version 2 and above)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)
- Publicon Document (NB)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format (after you submit your TEX file, you will be prompted to submit your BBL file). If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted DOC/ PDF/TEX/DVI file.

Article types

When submitting your manuscript, you will be asked to assign one of the following types to your article:

[Research article](#)

[Case report](#)

[Database](#)

[Debate](#)

[Software](#)

[Study protocol](#)

[Technical advance](#)

Please read the descriptions of each of the article types, choose which is appropriate for your article and structure it accordingly. If in doubt, your manuscript should be classified as a Research article, the structure for which is described below.

Manuscript sections for Research articles

Manuscripts for Research articles submitted to BMC Complementary and Alternative Medicine should be divided into the following sections:

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Background](#)
- [Methods](#)
- [Results](#)
- [Discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#) (if any)
- [Acknowledgements](#)
- [References](#)
- [Figure legends](#) (if any)
- [Tables and captions](#) (if any)
- [Description of additional data files](#) (if any)

You can [download a template](#) (compatible with Mac and Windows Word 97/98/2000/2003/2007) for your article. For instructions on use, see [below](#).

The Accession Numbers of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL: AB026295, EMBL: AC137000, DDBJ: AE000812, GenBank: U49845, PDB: 1BFM, Swiss-Prot: Q96KQ7, PIR: S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

Title page

This should list the title of the article. The title should include the study design, for example:

A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial

X is a risk factor for Y: a case control study

The full names, institutional addresses, and e-mail addresses for all authors must be included on the title page. The corresponding author should also be indicated.

Abstract

The abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: Background, the context and purpose of the study; Methods, how the study was performed and statistical tests used; Results, the main findings; Conclusions, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract; Trial registration, if your research article reports the results of a controlled health care intervention, please list your trial registry, along with the unique identifying number, e.g. Trial registration: Current Controlled Trials ISRCTN73824458. Please note that there should be no space between the letters and numbers of your trial registration number.

Background

The background section should be written from the standpoint of researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. Reports of clinical research should, where appropriate, include a summary of a search of the literature to indicate why this study was necessary and what it aimed to contribute to the field. The section should end with a very brief statement of what is being reported in the article.

Methods

This should include the design of the study, the setting, the type of participants or materials involved, a clear description of all interventions and comparisons, and the type of analysis used, including a power calculation if appropriate.

Results and Discussion

The Results and Discussion may be combined into a single section or presented separately. Results of statistical analysis should include, where appropriate, relative and absolute risks or risk reductions, and confidence intervals. The results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text, either they should be defined in the text where first used, or a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors should disclose any financial competing interests but also any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

- In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.
- Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.
- Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.
- Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you or one of your co-authors has a competing interest, please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An "author" is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the study by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include their source(s) of funding. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study.

The role of a medical writer must be included in the acknowledgements section, including their source(s) of funding.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements.

Please list the source(s) of funding for the study, for each author, and for the manuscript preparation in the acknowledgements section. Authors must describe the role of the funding body, if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication.

References

All references must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Reference citations should not appear in titles or headings. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished data", "unpublished observations", or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Notes/footnotes are not allowed. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited author(s) is the responsibility of the author. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should contain all named authors, regardless of how many there are.

Examples of the BMC Complementary and Alternative Medicine reference style are shown below. Please take care to follow the reference style precisely; references not in the correct style may be retyped, necessitating tedious proofreading.

Links

Web links and URLs should be included in the reference list. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database [http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do]

BMC Complementary and Alternative Medicine reference style

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

- [BibTeX](#)
- [EndNote style file](#)
- [Reference Manager](#)

Article within a journal

1. Koonin EV, Altschul SF, Bork P: BRCA1 protein products: functional motifs. *Nat Genet* 1996, 13:266-267.

Article within a journal supplement

2. Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction. *Proteins* 1999, 43(Suppl 3):149-170.

In press article

3. Kharitonov SA, Barnes PJ: Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

4. Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 1999, 42:s250.

Article within conference proceedings

5. Jones X: Zeolites and synthetic mechanisms. In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

6. Schnepf E: From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates. In *Origins of Plastids*. Volume 2. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

7. Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): *Innovative oncology*. In *Breast Cancer Res* 1998, 10:1-72.

Whole conference proceedings

8. Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996*; Baltimore. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

9. Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

10. Hunninghake GW, Gadek JE: The alveolar macrophage. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

11. Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

12. Kohavi R: *Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs*. PhD thesis. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

13. The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Microsoft Word template

Although we can accept manuscripts prepared as Microsoft Word, RTF or PDF files, we have designed a Microsoft Word template that can be used to generate a standard style and format for your article. It can be used if you have not yet started to write your paper, or if it is already written and needs to be put into BMC Complementary and Alternative Medicine style.

[Download the template](#) (Mac and Windows compatible Word 1998/2000) from our site, and save it to your hard drive. Double click the template to open it.

How to use the BMC Complementary and Alternative Medicine template

The template consists of a standard set of headings that make up a BMC Complementary and Alternative Medicine Research article manuscript, along with dummy fragments of body text. Follow these steps to create your manuscript in the standard format:

- Replace the dummy text for Title, Author details, Institutional affiliations, and the other sections of the manuscript with your own text (either by entering the text directly or by cutting and pasting from your own manuscript document).
- If there are sections which you do not need, delete them (but check the rest of the Instructions for Authors to see which sections are compulsory).
- If you need an additional copy of a heading (e.g. for additional figure legends) just copy and paste.

- For the references, you may either manually enter the references using the [reference style](#) given, or use bibliographic software to insert them automatically. We provide style files for [EndNote](#) and [Reference Manager](#).

For extra convenience, you can use the template as one of your standard Word templates. To do this, put a copy of the template file in Word's 'Templates' folder, normally C:\Program Files\Microsoft Office\Templates on a PC. The next time you create a new document in Word using the File menu, the template will appear as one of the available choices for a new document.

Preparing illustrations and figures

Figures should be provided as separate files. Each figure should comprise only a single file. There is no charge for the use of color.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- EPS (preferred format for diagrams)
- PDF (also especially suitable for diagrams)
- PNG (preferred format for photos or images)
- Microsoft Word (figures must be a single page)
- PowerPoint (figures must be a single page)
- TIFF
- JPEG
- BMP
- CDX (ChemDraw)
- TGF (ISIS/Draw)

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file immediately following the references, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing tables

Each table should be numbered in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title that summarizes the whole table, maximum 15 words. Detailed legends may then follow, but should be concise.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in portrait format (note that tables on a landscape page must be reformatted onto a portrait page or submitted as additional files). These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading should not be used.

Larger datasets can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final,

published form of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although BMC Complementary and Alternative Medicine does not restrict the length and quantity of data in a paper, there may still be occasions where an author wishes to provide data sets, tables, movie files, or other information as additional information. These files can be uploaded using the 'Additional Material files' button in the manuscript submission process.

The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Any additional files will be linked into the final published article in the form supplied by the author, but will not be displayed within the paper. They will be made available in exactly the same form as originally provided.

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text, immediately following the tables (if any):

- File name
- File format (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)
- Title of data
- Description of data

Additional datafiles should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'See additional file 1: Movie1 for the original data used to perform this analysis'.

Formats and uploading

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

- Additional documentation
 - PDF (Adobe Acrobat)
- Animations
 - SWF (Shockwave Flash)
- Movies
 - MOV (QuickTime)
 - MPG (MPEG)
- Tabular data
 - XLS (Excel spreadsheet)
 - CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions. This is especially important for Macintosh users, since the Mac OS does not enforce the use of standard extensions. Please also make sure that each additional file is a single table, figure or movie (please do not upload linked worksheets or PDF files larger than one sheet).

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

1. Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root
2. Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders
3. Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters
4. Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly

used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine

5. Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article

Style and language

General

Currently, BMC Complementary and Alternative Medicine can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

Gene names should be in italic, but protein products should be in plain type.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise. There is no restriction on the number of figures, tables or additional files that can be included with each article online. Figures and tables should be sequentially referenced. Authors should include all relevant supporting data with each article.

BMC Complementary and Alternative Medicine will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on "[Writing titles and abstracts for scientific articles](#)"

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [MedBioWorld](#) also provides a list of resources for science writing.

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They can be defined when first used or a list of abbreviations can be provided preceding the acknowledgements and references.

Typography

- Please use double line spacing.
- Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.
- Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.
- Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.
- All pages should be numbered.
- Use the BMC Complementary and Alternative Medicine reference format.
- Footnotes to text should not be used.
- Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full.

Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.

Units

SI Units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

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](#)