

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO BRUTO DE *Bauhinia holophylla* (Steud.) EM
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR
ESTREPTOZOTOCINA

NATHALIA AP. DE PAULA CAMAFORTE HENRIQUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Biologia de Processos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU-SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO BRUTO DE *Bauhinia holophylla* (Steud.) EM
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS INDUZIDOS POR
ESTREPTOZOTOCINA

NATHALIA AP. DE PAULA CAMAFORTE HENRIQUES
ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Biologia de Processos e
Sistemas.

BOTUCATU-SP

2013

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECARIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Henriques, Nathalia Aparecida de Paula Camaforte.

Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina / Nathalia Aparecida de Paula Camaforte Henriques. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Roberto Bosqueiro

Capes: 20702000

1. Diabetes. 2. Plantas medicinais. 3. Leguminosa. 4. Agentes hipoglicêmicos. 5. Modelos animais em pesquisa. 6. Pata de vaca. 7. Toxidade – Testes. 8. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus; Estreptozotocina; Plantas medicinais; Sinalização intracelular.

Auxílio Financeiro: FAPESP (Proc. Nº 2010/12901-4)
(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)



Dedico esse trabalho:

Aos meus pais Rosana Camaforte e Emílio Peral Camaforte por toda educação e amor que me deram sempre. Esse amor foi a base para meu crescimento, com vocês aprendi a não desistir diante das dificuldades encontradas e sempre acreditar em Deus. Aprendi que o amor vence qualquer obstáculo, vocês são referencial de garra e persistência. Obrigada por que sei que muitas vezes deixaram de realizar os seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Muito obrigada!

Agradeço,

Primeiramente a Deus, pois sem Ele a realização desse trabalho seria impossível. Obrigada por ter me capacitado e colocado paz no meu coração diante das dificuldades encontradas ao longo dessa jornada.

Em especial ao meu orientador José Roberto Bosqueiro por ter acreditado e confiado na minha capacidade para a realização desse trabalho e me dado a oportunidade de dar início a um sonho. Obrigada pelos conselhos e pelas broncas que com certeza colaboraram para o meu crescimento tanto profissional quanto pessoal. Agradeço também, à professora Anne Lígia Dokkedal pelo fornecimento dos extratos e dúvidas esclarecidas.

Em especial ao meu marido e amigo Diego Augusto Henriques por toda paciência, amor e dedicação comigo durante esses anos de casados. Obrigada pelos inúmeros finais de semana comigo no laboratório e horas perdidas de sono, por ter feito o serviço de estagiário (rs), obrigada por ouvir minhas explicações e mesmo sem entender absolutamente nada, fazer cara de quem entendeu e de que estava ótimo. Agradeço por mergulhar comigo na realização de mais esse sonho. “Te amo mais que ontem e muito menos que amanhã!”

À minha sogra Sônia Henriques por ser essa pessoa maravilhosa e amiga, mas principalmente por ter me dado o grande amor da minha vida, seu filho. Obrigada por ter confiado e acreditado em mim.

Aos meus irmãos Vinícius de Paula Camaforte (Gordo) e Renan de Paula Camaforte (Bebê) pela amizade e cumplicidade de todos esses anos, vocês são tudo para mim, os amo incondicionalmente! Obrigada por sonharem junto comigo!

À todos os meus familiares, em especial aos meus avós Soledade, Emílio, Dirce e Eurídes (in memoriam) por todo amor e por participarem, mesmo que de longe, das minhas conquistas. Obrigada aos meus tios Sú, Margareth, Daniel, Elaine e Ivan por todo amor, oração e carinho dedicado a mim! Os amo muito!

Aos meus amigos, Andressa, Bruna, Ercília, Maíara, Mariana, Leticia, Rafael, e William pela amizade e companheirismo. Cada palavra de incentivo de vocês foi muito importante para a realização dessa etapa. Agradeço também aos meus queridos amigos Elieser, Sílmara e Sophía, pelas orações e amizade de tantos anos. “Algumas amizades não duram nada, mas um verdadeiro amigo é mais chegado que um irmão (Provérbios 18:24)”.

Aos meus pastores Henrique Fontes e Isabel Fontes e à toda macrocélula Vidas com propósitos pelas orações e momentos de risadas, vocês são uma família para mim!

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino e “agregados”, Léo, Levy, Natalia, Priscilla e Stephanie pelas risadas e companheirismo ao longo desses anos. Em especial a Pri por todos os momentos que passamos juntas, pelas dúvidas sanadas, pelas ajudas durante os experimentos e por tantas loucuras em Nova York (rs). Naty, obrigada pelos Western Blott de “duplinha”, pelos conselhos divididos e por ter uma alegria tão contagiante.

Aos meus amigos e ex-colegas de trabalho da Penitenciária II de Bauru, Deizinha, Regislene, Verinha, Alice, Tio, Marcelo, Fausto, Maurício, Carlinhos, Pedrinho, Bombini, Dr. Wilson e ao querido Marcão. Obrigada por terem acreditado em mim e me dado força quando mais precisei, cada dia que passamos juntos foi muito especial, nunca me esquecerei das risadas, dos almoços, dos cafés da manhã

comemorativos, obrigada Tio pelas laranjas descascadas (rs). Passar esse tempo com vocês foi uma das melhores coisas que Deus me deu a chance de viver, cada um tem lugar cativo no meu coração. Obrigada!

Aos funcionários da Unesp de Bauru, em especial ao bioterista Thiago Tozi, que ajudou e muito para minimizar o trabalho com os animais e limpeza do biotério.

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelas informações prestadas, principalmente à Luciana por toda paciência e ajuda.

À Fapesp pelo apoio financeiro concedido (Processo nº 2010/12901-4)

Enfim, Obrigada à todos que diretamente ou indiretamente participaram e colaboraram para a realização dessa etapa. Peço a Deus que os abençoe grandemente e retribua em dobro tudo o que fizeram por mim.

Muito obrigada!

“Até aqui me ajudou o Senhor “

1 Samuel 7:12

Lista de Abreviaturas

ADA	Associação Americana de Diabetes
AKT	Serina treonina quinase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
BB	Ratos <i>Biobranding</i>
CTL EXT	Animais normoglicêmicos tratados com extrato bruto de <i>Bauhinia holophylla</i>
CTL SAL	Animais normoglicêmicos tratados com salina
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GAD65	Descarboxilase do ácido glutâmico
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GF	Glicogênio fosforilase
GS	Glicogênio sintase
GSK-3	Glicogênio sintase quinase 3
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
IAA	Anticorpos anti-insulina
ipGTT	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS 1	Substrato do receptor de insulina tipo 1

KOH	Hidróxido de Potássio
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
NaCl	Cloreto de Sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NOD	<i>Non Obese Diabetic</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
STZ	Estreptozotocina
STZ EXT	Animais diabéticos tratados com extrato bruto de <i>Bauhinia holophylla</i>
STZ SAL	Animais diabéticos tratados com salina
TC	Colesterol Total
TG	Triglicérides
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

Lista de Figuras

Figura 1: Classificação etiológica do <i>Diabetes mellitus</i>	25
Figura 2: Resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina após sua interação com receptor	28
Figura 3: Processos envolvidos no metabolismo de carboidratos pelo fígado ..	29
Figura 4: Esquema do mecanismo de ação da estreptozotocina e aloxana.....	33
Figura 5: Peso corpóreo dos animais após administração de 200mg/kg do extrato bruto de <i>B. holophylla</i> para avaliação do teste de toxicidade	47
Figura 6: Glicemia de jejum (mg/dL) de animais normoglicêmicos controle e diabéticos tratados com salina (CTLSAL e STZSAL) e normoglicêmicos e diabéticos tratados com extrato bruto de <i>B. holophylla</i> com uma dose de 400 mg/kg durante 15 dias (CTLEXT e STZEXT)	49
Figura 7: Conteúdo de glicogênio hepático (mg/%) dos animais normoglicêmicos controle e diabéticos tratados com salina ou tratados com extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	50
Figura 8: Conteúdo de glicogênio muscular (mg%) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. § vs. CTLEXT. Valores expressos como média ± EPM, p<0,05, n=8. ANOVA seguido de <i>post test Tukey</i>	50
Figura 9: Teste de tolerância à glicose dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	51

Figura 10: Área sob a curva dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias.....	53
Figura 11: Avaliação do peso corpóreo dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	54
Figura 12: Triglicérides (mg/dL) dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	56
Figura 13: Colesterol Total (mg/dL) dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	56
Figura 14: Proteínas Totais (mg/dL) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	57
Figura 15: Ingestão alimentar dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	58
Figura 16: Ingestão hídrica dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias.....	58
Figura 17: Expressão proteica de PI3K em fígado em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de <i>B. holophylla</i> na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias	59

Figura 18: Expressão proteica da AKT em fígado dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias 60

Figura 19: Expressão proteica da GS em fígado dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias 61

Lista de tabelas

Tabela 1: Pesos dos órgãos após 14 dias da administração de 2000mg/kg do extrato bruto de <i>B. holophylla</i>	48
Tabela 2: Efeito da administração do extrato de <i>B. holophylla</i> no teste de tolerância a glicose (ipGTT) após a administração intraperitoneal de glicose (2g/kg).....	52
Tabela 3: Pesos dos órgãos (g/kg peso corpóreo)	55

Resumo

O termo *Diabetes mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica que leva a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas resultante de defeitos na ação, secreção de insulina, ou ambos. Tais alterações levam a sérias consequências no indivíduo diabético, como perda de peso, aumento dos níveis de lipídeos no sangue podendo levar ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares como aterosclerose e infarto. Além disso, pode causar doenças renais e danos à visão, e em casos mais graves, óbito. A incidência de pessoas diabéticas tem aumentado a cada ano, e pesquisas realizadas recentemente apontam que esse é um número que só tende a aumentar nos próximos anos, principalmente devido aos péssimos hábitos alimentares e estilo de vida sedentário. O tratamento para o DM inclui insulinoterapia e o uso de hipoglicemiantes orais. No entanto, sabe-se que esses medicamentos possuem efeitos adversos, como ganho de peso, desconfortos abdominais e diarreias. Partindo dessas informações, a busca de novas alternativas para o tratamento de DM tem crescido muito nos últimos anos. O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas doenças, como o diabetes, é feito desde os primórdios da humanidade. Diante disso, a pesquisa envolvendo plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes tem sido alvo dos pesquisadores nos últimos anos, principalmente para comprovação da sua eficácia e verificação da toxicidade das mesmas. A família Fabaceae possui aproximadamente 300 espécies, popularmente conhecidas como pata-de-vaca ou unha-de-boi, devido ao formato de suas folhas e são amplamente utilizadas como analgésicos, antiinflamatórios e no tratamento de diabetes. O gênero *Bauhinia*, pertencente a essa família possui muitas espécies que são utilizadas no tratamento do diabetes. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Bauhinia holophylla*, uma espécie muito utilizada na medicina popular, porém sem estudos que comprovem sua eficácia, no tratamento de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Camundongos swiss machos diabéticos (STZSAL e STZEXT) e normoglicêmicos (CTLSAL e CTLEXT) foram tratados durante 15 dias com salina ou com o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* (400 mg/kg p.c.), dependendo do grupo experimental. Foram avaliados parâmetros como ingestão hídrica e alimentar, peso corpóreo, colesterol total, triglicérides, glicemia de jejum, tolerância à glicose e proteínas totais. O conteúdo do glicogênio hepático e muscular, assim como a expressão de algumas proteínas da via de

sinalização da insulina como AKT, PI3K e GS também foram avaliados. Foi realizado ainda, teste de toxicidade aguda em camundongos normoglicêmicos para observações comportamentais e pesagem dos órgãos após a administração de uma dose de 2000 mg/kg p.c. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test Tukey* com nível de significância de $p < 0,05$. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste *t* de Student não pareado com nível de significância de $p < 0,05$. O tratamento com o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* durante 15 dias na dose de 400 mg/kg p.c. promoveu melhora do quadro diabético dos animais, diminuindo a glicemia de jejum, a tolerância à glicose, os níveis de colesterol total e triglicérides, e aumentando o conteúdo do glicogênio hepático e a expressão das proteínas AKT e GS. O teste de toxicidade mostrou que o extrato não promoveu alterações comportamentais nos animais tratados, nem alterações no peso corpóreo e dos órgãos, mostrando ser seguro sua administração nessa dose. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* apresentou ação hipoglicemiante e hipolipidêmica, agindo em parte através de processos de captação e estocagem de glicose pelo fígado.

Palavras-chave: *Bauhinia holophylla*, *Diabetes mellitus*, plantas medicinais, sinalização da insulina.

Abstract

The term *Diabetes mellitus* (DM) defines a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia, which leads to alterations in carbohydrate, proteins and lipids metabolism resultant of defects in insulin action and/or secretion. Those alterations lead to serious consequences to diabetic people as weight loss, increase incidence of cardiovascular diseases, renal and optical diseases, and in some cases, death. The incidence of diabetic people is increasing every year and recently researches showed that this number will increase on next years, mainly due to bad eating habits and sedentary life style. The treatment of DM includes insulin therapy and the use of oral hypoglycemic agents. However, those medicaments have many collateral effects as weight gain, abdominal discomforts and diarrheas. Based on this information, studies involving new alternatives for the treatment of DM are growing in the last years. The use of medicinal plants in the treatment of diverse diseases like diabetes has been done since the beginning of humanity. Due to this, the studies involving medicinal plants with hypoglycemic properties have been the target of researches in the last years, mainly to verify its effectiveness and toxicity. The family Fabaceae has approximately 300 species, which are popularly called cow's foot and nail ox, due the format of theirs leafs and are largely used as analgesic, anti-inflammatory and hypoglycemic. The genus *Bauhinia*, belonging to this family has many species, which are used in diabetes treatment, and it has been researches target showing promising results. Because of that, the objective of this work was to evaluate the hypoglycemic activity of crude extract of *Bauhinia holophylla*, a species very used in traditional medicine. There are no studies that prove its effectiveness in the diabetes treatment. Swiss mice diabetic (STZSAL and STZEXT) and normoglycemic (CTLSAL and CTLEXT) received treatment for 15 days with the crude extract of *Bauhinia holophylla* (400 mg/kg b.w.). Water and food intake, body weight, total cholesterol, triglycerides, fasting glycemia, glucose tolerance test and total proteins were evaluated. The hepatic and muscular glycogen contents as well as the expression of some proteins of insulin signaling as AKT, PI3K and GS were also evaluated. We still perform the acute toxicity test in normoglycemic mice by the administration of a dose of 2000 mg/kg b.w. The results were expressed as MEANS $\pm$ SEM and to multiple parametric comparison ANOVA followed by post test Tukey was utilized with significance level adopted of $p < 0.05$. To compare two groups unpaired Student's *t* test was used with significance level $p < 0.05$. The

treatment with crude extract of *Bauhinia holophylla* for 15 days (400 mg/kg b.w.) promoted improvement in diabetic status decreasing fasting glycaemia, glucose tolerance, cholesterol and triglycerides levels. Increases in the hepatic glycogen content and the expression of AKT and GS were also observed. The acute toxicity test showed that crude extract did not promote behavioral alterations in treated animals, nor weight alterations and organs, showing to be safe the administration in this dose. With these results, we concluded that crude extract of *Bauhinia holophylla* has hypoglycemic and hypolipidemic effects, acting, at least in part, in the processes of uptake and storage of glucose in liver.

Keywords: *Bauhinia holophylla*, *Diabetes mellitus*, intracellular signaling, medicinal plants.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. DIABETES MELLITUS.....	23
1.2. CLASSIFICAÇÃO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	23
1.3. INSULINA.....	25
1.4. SINALIZAÇÃO DA INSULINA E SUAS AÇÕES METABÓLICAS.....	26
1.5. TRATAMENTOS PARA O <i>DIABETES MELLITUS</i>	30
1.6. DIABETES EXPERIMENTAL.....	31
1.7. FITOTERAPIA	33
1.8. GÊNERO <i>Bauhinia</i>	34
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBEJETIVO GERAL.....	37
2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO E ANÁLISES FARMACOGNÓSTICAS E QUÍMICAS	39
3.2. ANIMAIS	39
3.3. TESTE DE TOXICIDADE E “ <i>SCREENING HIPOCRÁTICO</i> ”.....	39
3.4. INDUÇÃO DO DIABETES.....	40
3.5. DIVISÃO DOS GRUPOS	40
3.6. TRATAMENTO.....	40
3.7. PESO CORPÓREO.....	41
3.8. AVALIAÇÃO DA GLICEMIA DE JEJUM	41
3.9. INGESTÃO HÍDRICA E ALIMENTAR	41
3.10. PARAMETROS BIOQUÍMICOS.....	41

3.11. GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR	42
3.12. EXTRAÇÃO PROTEÍCA E WESTERN BLOTT	42
3.13. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (ipGTT)	43
4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
5. RESULTADOS	46
5.1. TESTE DE TOXICIDADE E “ <i>SCREENING HIPOCRÁTICO</i> ”	47
5.2. GLICEMIA DE JEJUM	48
5.3. GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR	49
5.4. TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE INTRAPERITONEAL (ipGTT).....	51
5.5. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO	53
5.6. AVALIAÇÃO DO PESO DOS ÓRGÃOS.....	54
5.7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.....	55
5.8. INGESTÃO HÍDRICA E ALIMENTAR	57
5.9. EXPRESSÃO PROTEÍCA POR WESTERN BLOTT	59
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÃO	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9. ANEXOS	78
9.1. ANEXO 1.....	79
9.2. ANEXO 2.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1. DIABETES MELLITUS

O termo *Diabetes Mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica que leva a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas resultante de defeitos na ação, secreção de insulina, ou ambos. Os sintomas são poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar), acentuada perda de peso e cansaço (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Em 2010, o DM foi considerado a desordem endócrina mais comum, com prevalência de cerca de 6,4% da população mundial, afetando 285 milhões de adultos. Estima-se que chegará a acometer 439 milhões de adultos até 2030 (KUMAR et al., 2011). No Brasil, no final da década de 1980 estimava-se que cerca de 8% da população era acometida por essa doença, e no ano de 2012 chegou-se a um número de 12 milhões de diabéticos segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2012).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (2009), o número de casos tem aumentado devido ao envelhecimento da população, sedentarismo, maus hábitos alimentares, aumento da sobrevida de pacientes diabéticos e à maior urbanização. Ainda, dados brasileiros de 2006, apontam crescente aumento em relação ao número de óbitos relacionados à doenças que são consideradas complicações secundárias decorrentes do DM.

O DM quando não tratado, pode levar ao aparecimento de doenças decorrentes da hiperglicemia, como insuficiência renal, doenças cardiovasculares como aterosclerose e infarto, doenças na visão como catarata e até mesmo cegueira, neuropatia periférica podendo levar a ulcerações no pé e até mesmo amputação dos membros (ADA, 2011).

1.2. CLASSIFICAÇÃO DO *DIABETES MELLITUS*

A classificação proposta pela ADA e pela OMS inclui quatro principais tipos: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009) (Figura 1).

O DM1 é definido como diabetes causado por destruição autoimune das células produtoras de insulina – células β pancreáticas, com consequente dependência da insulina exógena para sobreviver. A grande maioria desses indivíduos desenvolvem anticorpos anti-ilhota (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da

descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A. Quando não há evidências da destruição das células β por processos autoimunes, é considerada DM1 do tipo idiopática. Esse tipo de DM é mais comum em crianças e jovens (JAHROMI & EISENBARTH, 2007).

O DM 2 é mais frequente, correspondendo a cerca de 95% dos casos, e tende a se manifestar em indivíduos adultos, com idade superior a 40 anos que possuem uma dieta inadequada, com vida sedentária (DIAS, MACIEL & SABLICH, 2007). É caracterizada por resistência à insulina e relativa deficiência na sua produção, sendo que a hiperglicemia se desenvolve lentamente, pois a resistência à insulina é compensada pelo aumento na sua secreção. No entanto, com o passar do tempo, se não houver tratamento adequado, esse aumento na secreção leva a uma progressiva exaustão e consequente morte das células β pancreáticas (SZKUDELSKI, 2012).

Outros tipos específicos de DM são menos comuns e estão relacionados a defeitos genéticos na célula β ou ação da insulina, doenças no pâncreas exócrino entre outras (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

O diabetes gestacional é definido como qualquer grau de diminuição da tolerância à glicose, cujo início ou detecção ocorre durante a gravidez. No Brasil cerca de 7% das gestações são complicadas por hiperglicemia gestacional. O diabetes pode permanecer ou não após o parto. Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes ao do DM2, incluindo idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso durante a gravidez, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, excesso de líquido amniótico, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez e antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal (GROSS et al., 2002; WEINERT et al., 2011).

TIPOS DE DIABETES	
1. Diabetes tipo 1	Destruição das células, levando a deficiência completa de insulina - Autoimune - Idiopático
2. Diabetes tipo 2	Graus variados de diminuição da secreção e resistência à insulina
3. Outros tipos específicos	- Defeitos genéticos da função da célula β - Defeitos genéticos da ação da insulina - Doenças no pâncreas exócrino - Endocrinopatias - Infecções - Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
4. Diabetes Gestacional	

Figura 1: Classificação etiológica do *Diabetes mellitus* (Adaptado de GROSS et al., 2002).

1.3. INSULINA

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico, que está intimamente relacionado com o *Diabetes mellitus*, uma vez que se constitui do principal hormônio regulador do metabolismo intermediário. É essencial para a manutenção da homeostase da glicose em vários tecidos, pelo crescimento e diferenciação celular (HABER, 2001). Também é responsável por estimular a lipogênese no fígado e adipócitos e reduzir a lipólise, bem como aumentar a síntese e inibir a degradação proteica (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002).

Com a sua descoberta em 1922 por Banting e Best, a insulina ganhou grande importância e significou grande avanço da ciência, pois naquela época os mecanismos componentes do metabolismo de nutrientes eram poucos conhecidos. Desde então houve um grande aumento dos estudos envolvendo a insulina, sua composição e estrutura. A insulina humana, assim como muitos hormônios proteicos, é sintetizada como uma proteína precursora maior, seguida de uma clivagem proteolítica, para gerar o hormônio ativo (WANG; TSOU, 1991).

Desse modo, sabe-se que a insulina é produzida como um único polipeptídeo, a pré-pró-insulina (inativa), que se constitui de uma cadeia de 110 aminoácidos. A molécula de insulina madura é formada a partir da pré-pró-insulina, e após a remoção de 23 aminoácidos na região aminoterminal e a formação de três pontes de dissulfeto, ocorre a formação da pró-

insulina, que é produzida no pâncreas pelas células β . Posteriormente, a remoção do peptídeo C leva a produção da insulina madura, que consiste de duas pequenas cadeias peptídicas, A e B, ligadas por pontes dissulfeto, a cadeia A com 21 aminoácidos e a cadeia B com 30 aminoácidos (STEINER et al., 1985).

1.4. SINALIZAÇÃO DA INSULINA E SUAS AÇÕES METABÓLICAS

A insulina é secretada principalmente em resposta ao aumento da glicose circulante após as refeições e age principalmente em tecidos periféricos, como músculo, fígado e tecido adiposo, promovendo diminuição da glicemia (ZECHIN; CARVALHEIRA & SAAD, 2004)

A insulina exerce diversos efeitos metabólicos e mitogênicos mediados por seu receptor, presente em praticamente todos os tecidos dos vertebrados. Os efeitos metabólicos imediatos da insulina incluem aumento da captação periférica da glicose especialmente nos tecidos adiposo e muscular, através do aumento da translocação do transportador de glicose do tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática do adipócito e músculo. Além disso, a insulina promove a fosforilação intracelular de glicose, levando à formação de glicose-6-fosfato para posterior processamento e estocagem na forma de glicogênio em fígado e músculo esquelético pelo processo de glicogênese. A insulina inibe ainda processos como a neoglicogênese e glicogenólise, processos estes que aumentam a formação de glicose para posterior liberação na corrente sanguínea (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002). A insulina ainda é responsável por mediar efeitos como síntese de proteínas, ácidos graxos, bem como inibir a lipólise e proteólise. Além disso, atua na proliferação e diferenciação celular (TAHA & KLIP, 1999; ZECHIN; CARVALHEIRA & SAAD, 2004).

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana com atividade cinase, composto por duas subunidades α e duas subunidades β , sendo que a subunidade α inibe a atividade da β . Este receptor está presente em praticamente todas as células dos vertebrados, variando de 40 receptores em um eritrócito a 200.000 em cada célula adiposa e hepática (HABER, 2001). A ligação da insulina à subunidade α (extracelular) permite que a subunidade β (intracelular) adquira atividade cinase, levando a uma mudança conformacional e sua autofosforilação, aumentando ainda mais a atividade do receptor. Em seguida, ocorre a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) (Figura 2). Até o momento, foram descritos dez isoformas de substratos de receptor de insulina, sendo quatro as proteínas pertencentes à família dos IRS (IRS-1, IRS-2,

IRS-3, IRS-4). Os demais incluem Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002).

No ano de 1998, Shepherd et. al estabeleceram as funções fisiológicas das proteínas IRS-1, 2, 3 e 4 e foi descoberto que o IRS-1 está intimamente relacionado com a sensibilidade à insulina em tecidos periféricos e com crescimento celular, uma vez que foi observado neste trabalho que camundongos que não expressam IRS-1 apresentam resistência à insulina e retardo de crescimento e, no entanto, não apresentam hiperglicemia. O IRS-2 parece estar ligado à ação da insulina e à falência da secreção pelas células β . Camundongos *knockout* para essa proteína apresentaram hiperglicemia acentuada, devido a diversas deficiências na ação da insulina nos tecidos periféricos e à falência da sua secreção pelas células β , bem como redução significativa de massa destas células. As isoformas IRS-3 e 4 parecem não apresentar efeitos sobre o metabolismo da glicose.

Uma das mais importantes moléculas ativadas pelos IRS é a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), que após estimulação da insulina, é ativada pelo IRS-1. A PI3K é importante na regulação de processos como mitogênese, metabolismo de glicose, diferenciação celular e para a translocação do GLUT4. Outro grupo de proteínas chamadas AKT ou proteína cinase B, são extremamente importantes na via de sinalização de insulina. A fosforilação da AKT ocorre por ação da PI3K, resulta em processos como aumento da captação de glicose através da translocação de vesículas contendo GLUT 4 (BRYANT et al., 2002).

A via de sinalização de insulina constitui-se de duas distintas vias: AKT/GSK3 β e RAS/ERK. A primeira é responsável por mediar os efeitos glicotrópicos, incluindo a estimulação da captação da glicose periférica e produção de glicogênio e lipídeos, enquanto que a via RAS/ERK media os efeitos proliferativos ou mitogênicos (LIU et al., 2010).

A insulina é extremamente importante no metabolismo de carboidratos. No fígado, é responsável por estimular a oxidação de glicose (glicólise) para formação de ATP, seu armazenamento na forma de glicogênio (glicogênese), bem como inibir a glicogenólise (degradação de glicogênio) e a neoglicogênese (síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos).

responsável por esse processo. Todos os aminoácidos, exceto lisina e leucina, podem originar glicose através da sua conversão a piruvato. Essa conversão ocorre no sentido oposto ao da glicólise, utilizando-se de quase todas as enzimas envolvidas nesse processo, exceto piruvato cinase, fosfofrutocinase e glicocinase (PRABHAKAR & DOBLE, 2008). A insulina é responsável por inibir a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK), enzima chave no controle desse processo. Esse hormônio também é responsável por inibir as enzimas frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase, que são responsáveis pela formação de glicose-6-fosfato que será convertida à glicose e liberada na corrente sanguínea, além de aumentar a transcrição de genes que codificam enzimas glicolíticas como glicocinase e a piruvato cinase, responsáveis pela oxidação da glicose para posterior utilização pelo ciclo de Krebs (PILKS & GRANER, 1992; SURTHERLAND et al., 1996) (Figura 3).

Na célula muscular e no adipócito, a insulina é essencial para promover a captação de glicose através do estímulo para a translocação do GLUT4 para a membrana celular, sua utilização como fonte energética e estocagem na forma de glicogênio. Nesses tecidos, a insulina pode estimular ainda a lipogênese e inibir a lipólise (quebra de triglicerídeos) e proteólise e estimular a síntese de proteínas (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002).

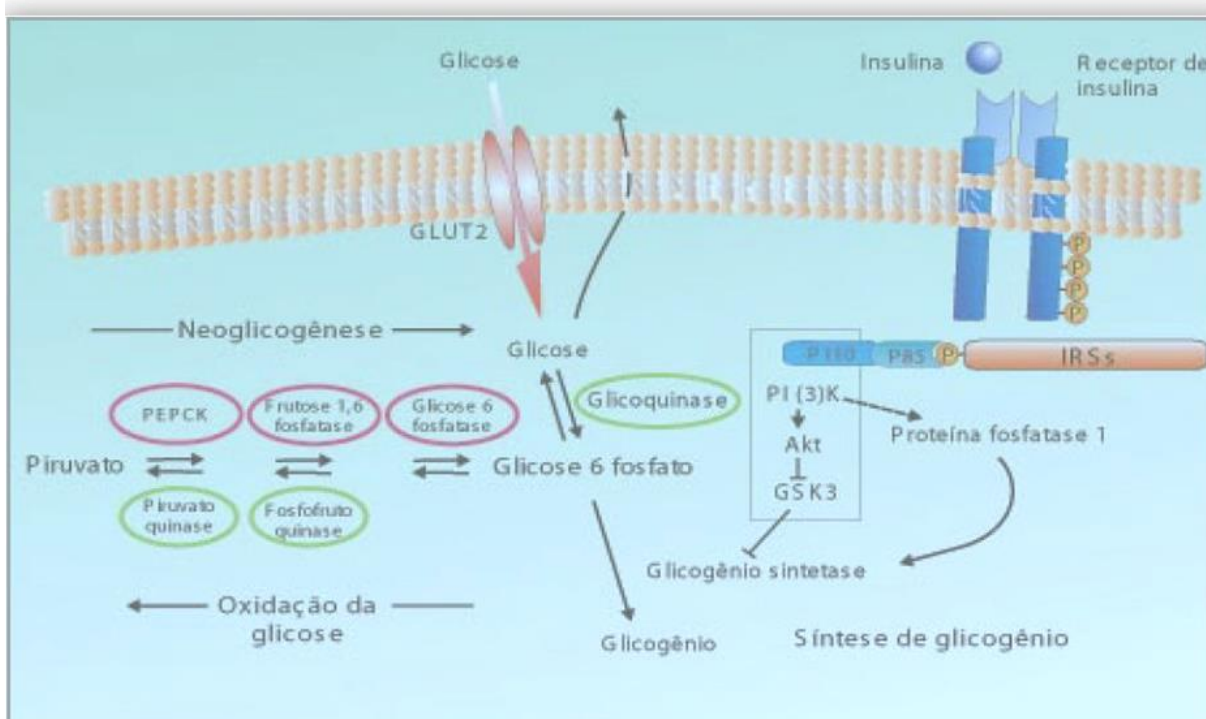


Figura 3: Processos envolvidos no metabolismo de carboidratos pelo fígado (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002).

1.5. TRATAMENTOS PARA O *DIABETES MELLITUS*

Atualmente para o tratamento de DM, recorre-se à insulinoterapia e administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da α -glicosidase e α -amilase (ascarbose, miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto. No entanto estes medicamentos possuem muitos efeitos adversos (HSU et al., 2009). O uso desses medicamentos somente é indicado para o tratamento de diabetes quando a dieta hipocalórica e atividades físicas não forem capazes de controlar a glicemia (ARAÚJO; BRITTO; CRUZ, 2000).

As biguanidas (metformina) melhoram a ação da insulina no fígado diminuindo a gliconeogênese e no músculo aumentando a captação de glicose, além de estimular a glicogênese. No adipócito inibem a lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres. Em nível molecular foi observado que a metformina aumenta a atividade tirosina-cinase do receptor de insulina, estimulando a translocação do GLUT4 e a atividade da enzima glicogênio sintetase. Os efeitos adversos mais frequentes são diarreia, gosto metálico e náuseas (JOHANSEN, 1999).

As Sulfoniluréias, como a clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e glimeperida, são drogas hipoglicemiantes que atuam diretamente no pâncreas agindo como liberadores de insulina. Os efeitos colaterais são observados em 3% dos pacientes e incluem hipoglicemia, alterações hematológicas (leucopenia, trombocitopenia e anemia) e gastro-intestinais (náusea, vômito) e reações alérgicas (ARAÚJO; BRUTO & CRUZ, 2000).

Inibidores da α -amilase e α -glicosidase, como ascarbose e viglibose, são pseudo-oligossacarídeos inibidores competitivos das enzimas responsáveis pela quebra de amido, dextrina, maltose e sacarose em monossacarídeos absorvíveis. Esses inibidores diminuem, mas não impedem a absorção de glicose, reduzindo assim a glicemia pós prandial e os picos de insulina. No entanto, a administração desses fármacos possui efeitos adversos como flatulência e diarreia (ANDRADE-CETTO et al., 2010; KUMAR et al., 2012).

As tiazolidinedionas, como rosiglitazona e pioglitazona, agem aumentando a ação da insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, diminuindo a resistência à insulina. Aumentam a expressão do GLUT4 e da lipoproteína lipase, além de reduzir a expressão da leptina, controlando o apetite. A rosiglitazona é mais potente e tem menor toxicidade hepática. Os efeitos adversos ocorrem em 5% dos pacientes e incluem edemas, aumento do peso e anemia (ARAÚJO; BRUTO & CRUZ, 2000).

O principal objetivo dessas drogas é, inicialmente, aumentar o tempo e a qualidade de vida do paciente bem como aliviar seus sintomas e, posteriormente, diminuir os riscos de desenvolvimento das complicações secundárias da doença, aumentando assim a longevidade do paciente. Esses medicamentos devem ser prescritos juntamente com uma dieta adequada e mudanças no estilo de vida do paciente como a inclusão de exercícios físicos como hábito diário para pacientes com DM tipo 2 (BASTAKI, 2005).

Infelizmente, como dito anteriormente, todas essas drogas possuem efeitos adversos, como ganho de peso, hipoglicemia, edemas, distúrbios gastrointestinais e indução de resistência à insulina (VASCONCELOS et al., 2011).

1.6. DIABETES EXPERIMENTAL

O diabetes experimental tem sido muito utilizado na pesquisa científica para maiores esclarecimentos acerca do DM. Tais modelos de animais diabéticos podem ser conseguidos por indução química ou espontânea (SZKULDESKI, 2001).

A indução química do diabetes, em animais experimentais, ocorre após destruição química seletiva das células β pancreáticas. As substâncias mais utilizadas para a indução em ratos, camundongos e coelhos são aloxana e estreptozotocina (STZ) e a dose para a indução depende da espécie (KIRSTEN, 2010). A STZ é um glicosídeo nitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*. Essa substância, na dose de 160 a 250 mg/kg, apresenta efeito citotóxico direto sobre as células β de camundongos e na dose de 40 mg/kg pode produzir insulite pancreática, com morte progressiva das células β levando também ao DM. O seu efeito diabetogênico, resultado de uma injúria nas células β do pâncreas, inicia-se pela sua entrada na célula através do transportador de glicose (GLUT2). Tem sido relatado que a exposição das células secretoras de insulina à STZ causa danos ao DNA, através da formação de óxido nítrico (NO), um agente citotóxico, levando à morte das células β pancreáticas (KIRSTEN, 2010; SZKULDESKI, 2001). Duas horas após a injeção de STZ já se observa hiperglicemia, devido à diminuição de produção de insulina e após seis horas, devido à morte das células β e concomitante liberação maciça da insulina nelas contidas, ocorre hipoglicemia. Então, dias depois, a hiperglicemia se desenvolve e ocorre diminuição irreversível dos níveis de insulina (WEST et al., 1996).

A aloxana, um derivado de pirimidina, exerce sua ação diabetogênica quando administrada intravenosa, intraperitoneal ou subcutaneamente. Para indução intravenosa em ratos a dose é de 65 mg/kg, enquanto que a dose intraperitoneal ou subcutânea efetiva deve ser 2 a 3 vezes maior do que esse valor (KIRSTEN, 2010). No entanto a dose requerida depende da espécie animal, rota de administração e estado nutricional. O mecanismo de ação da aloxana tem sido muito estudado, principalmente *in vitro*, e sabe-se que age através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo que seu acúmulo nas células leva à morte das células β pancreáticas. Apesar da sua característica diabetogênica, muitos pesquisadores sugerem que sua seletividade de ação não é muito satisfatória (LENZEM, 2008; SZKULDESKI, 2001). Além disso, há muitos problemas relacionados à sua instabilidade química e metabolização rápido que tornam difícil o estabelecimento de uma relação clara entre as doses da mesma e sua concentração efetiva (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

Os modelos experimentais do DM espontâneos têm sido estudados devido a dois fatores que se complementam: os defeitos imunológicos e a pré-disposição genética. Para o DM1, o modelo mais utilizado e que se assemelha muito com o DM1 em humanos, são os camundongos NOD (*Non Obese Diabetic*) e os ratos BB (*Biobreanding*). Os dois modelos apresentam hipoinsulinemia, hiperglicemia (20 a 30 mmol/L, que equivale a 360 a 540 mg/dL), glicosúria, perda de peso, polidipsia, e poliúria aos 3 meses de idade, aproximadamente. Os camundongos NOD exibem autoimunidade espontânea que causa diabetes através da destruição das células produtoras de insulina, de forma semelhante à observada em humanos, sendo que a destruição autoimune é caracterizada por insulite, resultado de infiltração leucocitária nas ilhotas pancreáticas. Esse infiltrado é composto predominantemente por células dendríticas, macrófagos, por células T ($CD4^+$ e $CD8^+$). Células B e algumas células NK também podem ser encontradas (KIRSTEN, 2010).

Para modelos de DM tipo 2, existem os camundongos que desenvolvem obesidade espontaneamente como os ob/ob e db/db. Os camundongos ob/ob carregam uma mutação no gene ob, identificado como codificador do hormônio leptina. Quando não há produção de leptina, o indivíduo torna-se obeso (TARTAGLIA et al., 1995).

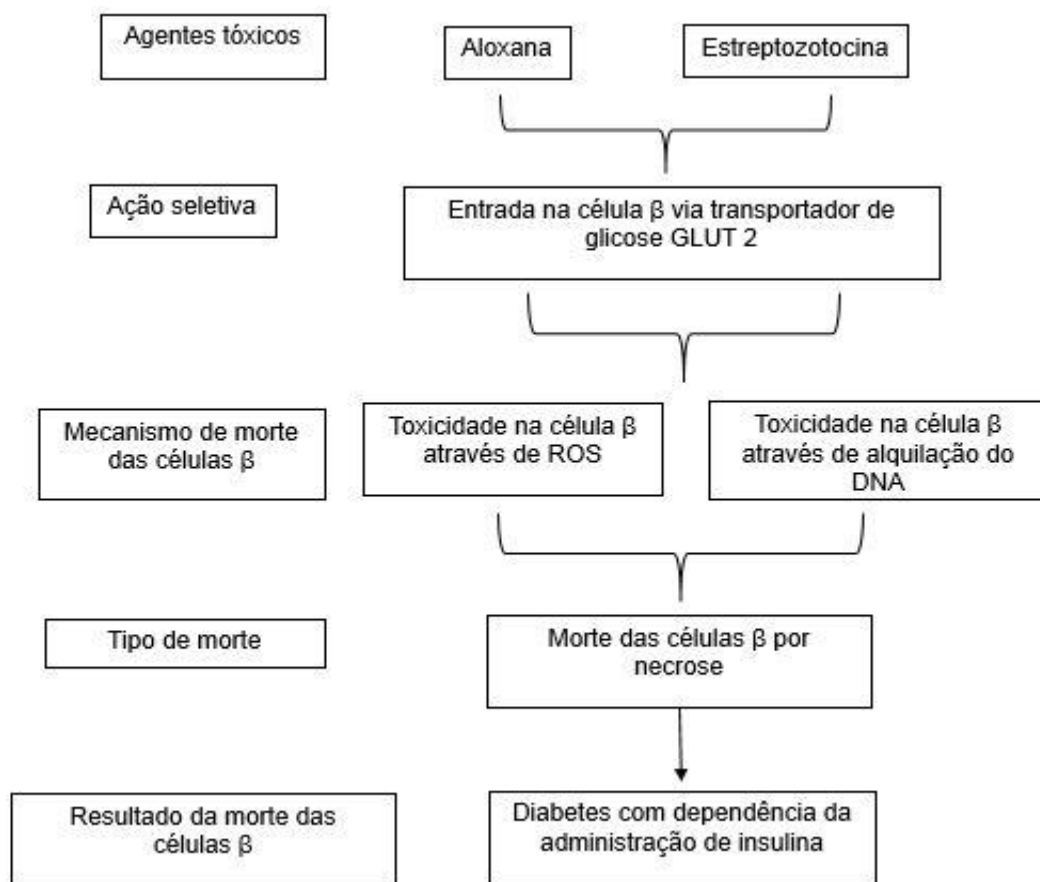


Figura 4: Esquema do mecanismo de ação da estreptozotocina e aloxana (Adaptado de LENZEM, 2008).

1.7. FITOTERAPIA

A utilização de plantas medicinais é feita desde os primórdios da humanidade e no passado era uma importante fonte de recursos terapêuticos. Atualmente sabe-se que 25% das drogas existentes no mercado são derivadas de plantas e muitas outras são sintéticas análogas, produzidas a partir de compostos isolados de plantas (MUTHEE et al., 2011).

Nos últimos anos, verifica-se um grande aumento dos estudos relacionados às plantas medicinais e suas propriedades terapêuticas para comprovação do que se conhece empiricamente, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins e muito utilizada pela população de menor poder aquisitivo devido ao fácil

acesso e baixos custos quando comparados com medicamentos alopáticos (AMARAL et al., 2005; DA SILVA & CECHINEL FILHO, 2002). O mercado dos fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 21,7 bilhões por ano em todo o mundo (CARVALHO et al., 2008).

A ação medicinal das plantas se deve principalmente à presença dos chamados metabólitos secundários que estão envolvidos em processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, como flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos entre outros (MAZID et al., 2011).

Plantas medicinais e seus produtos naturais são utilizados no tratamento do DM e muitas outras doenças por possuírem benefícios como eficiência, segurança, acessibilidade e aceitabilidade por parte dos pacientes. Nos últimos anos, têm sido alvo de pesquisas científicas para comprovação dos seus efeitos e melhor entendimento de seus mecanismos de ação (KUMAR et al., 2005).

A atividade hipoglicemiante de plantas medicinais pode ocorrer através da sua habilidade de restaurar a função pancreática resultando em aumento da liberação de insulina, através da inibição da absorção intestinal de glicose ou ainda por facilitar os processos metabólicos dependentes de insulina, sendo que em alguns casos seus efeitos são similares ao das drogas convencionais (MALAVIYA et al., 2010).

1.8. GÊNERO *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia*, pertencente à família Fabaceae, possui aproximadamente 300 espécies, popularmente conhecidas como pata-de-vaca ou unha-de-boi, devido ao formato de suas folhas. Estão distribuídas em países tropicais, incluindo África, Ásia, e América do Sul. Suas folhas e casca são amplamente utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças, como diabetes, infecções, como antiinflamatórios e analgésicos (CECHINEL-FILHO, 2002; FOGLIO et al., 2006).

Nos últimos anos houve um grande crescimento no número de estudos por parte da comunidade científica em relação às plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia*, desde que alguns testes com algumas plantas comprovaram sua eficácia no tratamento de doenças como diabetes. Estudos indicam que a presença de flavonoides na composição química dessas plantas são os grandes responsáveis pelo potencial terapêutico (DA SILVA & CECHINEL FILHO, 2002; DA SILVA et al., 2010).

Algumas espécies como *B. forficata* são muito utilizadas na medicina popular brasileira e têm demonstrado efeito hipoglicemiante. Outras espécies como *B. purpúrea*, *B. malabarica*, *B. fassoglensis*, *B. candicans* e *B. racemosa* são utilizadas no tratamento de muitas outras doenças (PEPATO et al., 2002).

Fuentes et. al (2004) verificaram que o extrato de *B. candicans* possui atividade hipoglicemiante em coelhos, por administração da fração butanólica do extrato a uma dose de 8 mg/kg.

Rodriguez et. al (2010) comprovaram que o constituinte isolado da planta *Bauhinia megalandra*, caempferol 3-0- α -rhamnosídeo, um flavonoide, foi capaz de inibir em 28% a absorção de glicose pelo trato intestinal, diminuindo assim os níveis da glicose pós-prandial, apresentando, portanto, efeitos similares ao das drogas convencionais inibidoras da α -amilase e α -glicosidase, ascarbose e miglitol. Quercetina, caempferol e miricetina isolados do extrato etanólico das folhas de guava mostraram potente ação inibitória da enzima α -amilase (WANG et al., 2010).

Gonzalez-Mujica et. al (2003) testaram o efeito hipoglicemiante do extrato aquoso das folhas de *B. megalandra* e foi constatado que essa planta age através da inibição da absorção de glicose intestinal em uma dose de 262,5 mg/kg do extrato.

Estrada et. al (2005) verificaram que alguns componentes isolados do extrato bruto das folhas da *B. megalandra* são potentes inibidores da enzima glicose-6-fosfatase, importante enzima do processo de neoglicogênese.

No entanto outras espécies também muito utilizadas na medicina tradicional como hipoglicemiantes como, por exemplo, a *Bauhinia holophylla* ainda não possuem estudos comprovando suas ações antidiabéticas (DA SILVA & CECHINEL FILHO, 2002; DA SILVA et al., 2010).

Estudos a respeito da química do extrato bruto de *Bauhinia holophylla* Pieroni et. al (2013) analisaram o seu perfil químico, e observaram que o extrato é rico em heterosídeos de flavonoides derivados de quercetina e miricetina, importantes antioxidantes naturais para o tratamento do diabetes¹ (em fase de elaboração).

¹PIERONI, L.G; ALMEIDA, L. F. R; XIMES, V. F.; VILLEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. CONSTITUINTES QUÍMICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ALELOPÁTICA DE *Bauhinia holophylla* (BONG.) STEUD.

2. OBJETIVOS

2.1. OBEJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato bruto das folhas de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por administração de estreptozotocina.

2.1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a toxicidade do extrato bruto de *B. holophylla* administrado com uma dose de 2000mg/kg em camundongos normoglicêmicos.
- Avaliar glicemia de jejum, colesterol total e triglicérides dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados durante 15 dias com salina ou o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.
- Avaliar a tolerância à glicose dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados durante 15 dias com salina ou o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.
- Quantificar o conteúdo de glicogênio hepático e muscular dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados durante 15 dias com salina ou o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.
- Avaliar a ingestão hídrica e alimentar, bem como o peso corpóreo dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados durante 15 dias com salina ou o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina envolvidas no metabolismo de glicose como AKT, PI3K e GS assim como suas formas fosforiladas, em fígado de animais normoglicêmicos e diabéticos tratados durante 15 dias com salina ou o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DO EXTRATO E ANÁLISES FARMACOGNÓSTICAS E QUÍMICAS

Conforme o aspecto multidisciplinar do grupo envolvido no Projeto Temático aprovado pela Fapesp sob o protocolo número 09/52237-9, a coleta e identificação do material botânico, a obtenção do extrato, a etapa farmacognóstica e o isolamento e identificação dos principais componentes do extrato, ocorreram sob a responsabilidade de outros membros do grupo, sobretudo da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro (FC, UNESP, Bauru).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos com 60±10 dias de idade, provenientes do biotério central da UNESP, localizado no campus de Botucatu, SP. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro (12 horas) com livre acesso à água e à ração balanceada. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Odontologia da Unesp Araçatuba (Processo nº 01742-2012 – Anexo 1).

3.3. TESTE DE TOXICIDADE E “*SCREENING HIPOCRÁTICO*”

Camundongos Swiss normoglicêmicos foram divididos em dois grupos - CTLSAL e CTLEXT (n=10) - deixados em jejum por 4 horas. Após esse período, foi administrado salina (1ml/kg) ou extrato bruto de *B. holophylla* (2000 mg/kg p.c.) por gavagem de acordo com os grupos. Após a administração, os animais tiveram seus comportamentos avaliados nos tempos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a realização da gavagem (anexo 2), conforme descrito por Brito (1994). Após avaliação comportamental, os animais tiveram ainda seus pesos corpóreos analisados por 14 dias e ao fim desse período, foram sacrificados para avaliação do peso dos órgãos como fígado, rins, coração, pulmões e baço. Os dados foram expressos pelo arcosseno do peso do órgão/peso do animal.

3.4. INDUÇÃO DO DIABETES

Os animais foram induzidos quimicamente ao diabetes através de injeção única de estreptozotocina (STZ - Sigma® - St. Louis, MO) na dose de 150 mg/kg em camundongos em jejum por um período de 10 a 12 horas. A STZ foi dissolvida em tampão citrato de sódio (pH 4,5). Os animais receberam alimento após 3 horas da injeção de STZ juntamente com solução de glicose 10%. Após sete dias, com a confirmação da instalação do diabetes, através de sintomas como poliúria e glicemia de jejum acima de 250 mg/dL, os animais foram separados e incluídos nos grupos experimentais.

3.5. DIVISÃO DOS GRUPOS

Os animais foram escolhidos aleatoriamente e divididos em quatro grupos:

- **Grupo CTLSAL:** Animais normoglicêmicos que receberam diariamente gavagem com salina durante os 15 dias de tratamento.
- **Grupo CTLEXT:** Animais normoglicêmicos que receberam gavagem com extrato bruto de *Bauhinia holophylla* (400 mg/kg p.c., diluído em salina) durante 15 dias.
- **Grupo STZSAL:** Animais diabéticos que receberam gavagem de salina durante os 15 dias de tratamento.
- **Grupo STZEXT:** Animais diabéticos que receberam gavagem de extrato bruto de *Bauhinia holophylla* (400 mg/kg p.c. diluído em salina) durante 15 dias.

3.6. TRATAMENTO

Os animais foram tratados de acordo com os grupos durante 15 dias. Os grupos CTLSAL e STZSAL receberam gavagem diariamente (0,9g de NaCl/100 mL de água) durante 15 dias consecutivos. Os animais do grupo CTLEXT e STZEXT receberam gavagem do extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. A gavagem foi realizada uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, entre 7 e 9 horas da manhã. Após o tratamento, os animais foram anestesiados em câmara de CO₂ e mortos por

decapitação. Foram coletados sangue para análises bioquímicas, fígado e músculo gastrocnêmio para análise do conteúdo de glicogênio e fígado para análise da expressão proteica por Western Blott.

3.7. PESO CORPÓREO

Os animais tiveram seus pesos corpóreos mensurados em balança eletrônica (Filosola) diariamente durante os 15 dias de tratamento. Os pesos foram expressos em gramas.

3.8. AVALIAÇÃO DA GLICEMIA DE JEJUM

Os animais de todos os grupos ficaram em jejum por um período de 10-12 horas e tiveram a glicemia medida por Glicosímetro (One Touch Jonshon & Jonshon) a cada sete dias.

3.9. INGESTÃO HÍDRICA E ALIMENTAR

A avaliação da ingestão hídrica e alimentar foi realizada diariamente durante os 15 dias de tratamento. A ingestão alimentar foi corrigida pelo peso dos animais e foi expressa em g/100g de peso corpóreo.

3.10. PARAMETROS BIOQUÍMICOS

Ao final do tratamento, os camundongos de todos os grupos foram deixados em jejum por um período de 10-12 horas. Após esse período, os animais foram anestesiados e mortos por decapitação e o sangue coletado foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para quantificação de triglicérides, colesterol total e proteínas totais através de kits comerciais (Doles®, Goiás, Brasil) e quantificados em espectrofotômetro (BioTek® – PoweWave XS).

3.11. GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

Durante o sacrifício, foram removidos de 300 a 500 mg de fígado e de 150 a 300 mg de músculo gastrocnêmio para quantificação de glicogênio hepático e muscular. Em seguida as amostras foram digeridas em 2 mL de KOH 30% em tubos falcon em banho Maria fervente por 1 hora. Após esta fase, foi acrescentado 0,2 mL de Na₂SO₄ e o material foi agitado. Em seguida, foram adicionados 6,0mL de etanol, agitado novamente e levado ao banho Maria. O material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi então ressuspensionado em 2 mL de água destilada quente. Posteriormente, foram acrescentados 6,0 mL de etanol e o material foi agitado e aquecido em banho Maria e novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. O precipitado foi diluído em 15 µL de solução fenol e 2 mL de ácido sulfúrico. Após diluição do precipitado o conteúdo foi levado ao banho fervente por 15 minutos e então o conteúdo de glicogênio quantificado por espectrofotometria a 490nm (RAFACHO et al., 2007).

3.12. EXTRAÇÃO PROTEÍCA E WESTERN BLOTT

Porções do fígado foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) em coquetel anti-protease a 4°C. Após 20 minutos de centrifugação em 12.000 rpm a 4°C, o conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. Aliquotas contendo 100 µg de proteína total foram fervidas a 100°C por 4 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas em sistema de eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida com o tamanho dos poros adequado para cada peso molecular. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS em voltagem constante de 120 Volts. A membrana foi então saturada com solução bloqueadora contendo BSA 5% em solução basal (10mM Trisma base, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) “overnight”. Em seguida a membrana foi lavada com solução basal a temperatura ambiente (TA). As proteínas foram detectadas na membrana após incubação por 3h a 4°C com anticorpo primário específico para cada uma em solução basal contendo albumina 3%, seguida de

lavagem e incubação por uma hora e meia com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP em solução basal contendo leite desnatado 1% a TA. As membranas foram lavadas e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) e expostas ao filme auto-radiográfico (Kodak T-Mat G/RA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria (RAFACHO et al., 2007).

3.13. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE INTRAPERITONEAL (ipGTT)

Para verificar a tolerância à glicose dos animais, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT). Após 15 dias de tratamento os camundongos foram submetidos a um jejum de 10-12h antes do procedimento experimental. Ao início do experimento, foram anestesiados com Tiopental® (60 mg/kg) e, em seguida, foi coletado sangue para a dosagem da glicemia de jejum dos animais (tempo 0'). Logo após esses procedimentos, foi administrado o extrato bruto das folhas de *B. holophylla* e após 30 minutos, foi administrada glicose intraperitonealmente na dose de 2g/kg e a partir de então, o sangue foi coletado nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. A coleta de sangue em todos os tempos foi realizada pela cauda do animal e a glicemia medida através de glicosímetro (One Touch Jonshon & Jonshon).

4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test Tukey* e, para comparação de dois grupos, teste *t* de Student. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. TESTE DE TOXICIDADE E “SCREENING HIPOCRÁTICO”

O extrato bruto de *B. holophylla* administrado na dose de 2000 mg/kg aos camundongos normoglicêmicos (CTLEXT) não causou nenhuma alteração comportamental avaliado em comparação aos animais tratados somente com salina (CTLSAL) (Anexo 2). Ao longo dos 14 dias de observação, não houve morte dos animais e nem alteração do peso corpóreo (figura 5). Além disso, ao final dos 14 dias, órgãos como baço, fígado, rins, pulmões e coração foram retirados para avaliação e não foi constatada diferença significativa no peso dos mesmos nos animais do grupo CTLEXT em relação ao grupo CTLSAL (Tabela 1) ($p>0,05$).

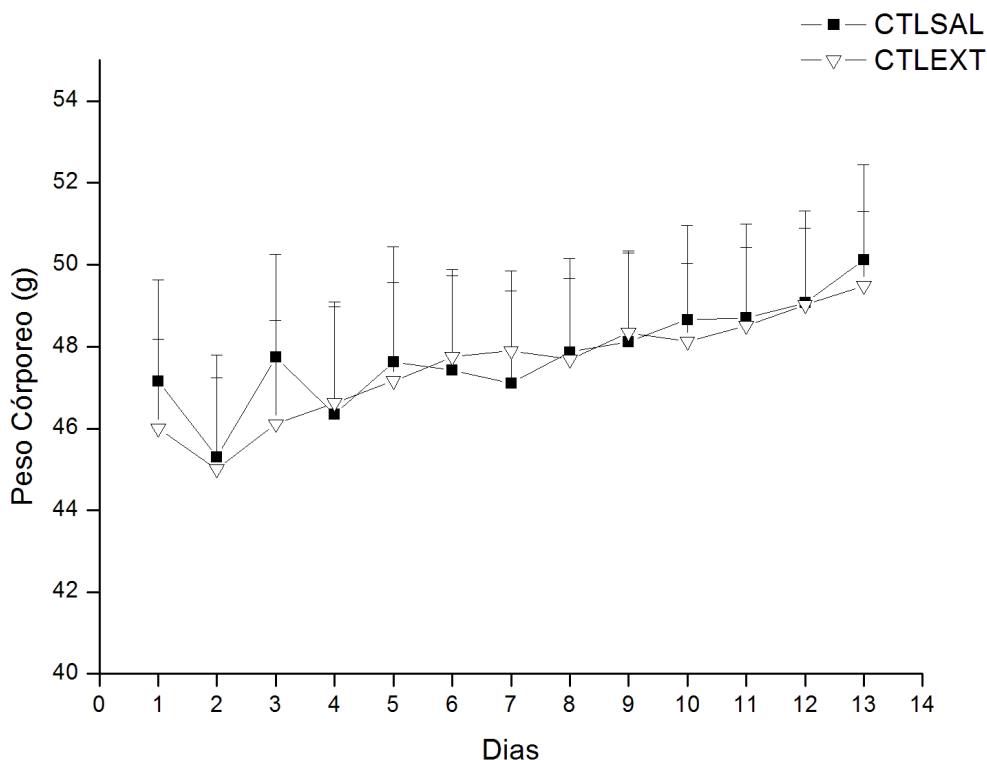


Figura 5: Peso corpóreo dos animais após administração de 200mg/kg do extrato bruto de *B. holophylla* para avaliação do teste de toxicidade. Não houve diferença significativa do peso corpóreo do grupo CTLEXT em relação ao grupo CTLSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p<0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

Tabela 1: Pesos dos órgãos (g) após 14 dias da administração de 2000mg/kg do extrato bruto de *B. holophylla*.

	Coração	Fígado	Rins	Pulmão	Baço
CTLSAL	4,82 ± 0,1	54,8 ± 2,5	12,7 ± 0,4	8,9 ± 0,6	4,0 ± 0,3
CTLEXT	4,92 ± 0,2	54,9 ± 1,9	13,8 ± 0,7	9,7 ± 0,7	4,1 ± 0,1

CTLSAL – animais normoglicêmicos tratados com salina na dose de 1mL/kg. CTLEXT – animais normoglicêmicos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 2000mg/kg. Não houve diferença estatística entre os grupos CTLSAL e CTLEXT. Valores expressos como média ± EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.2. GLICEMIA DE JEJUM

Os animais diabéticos induzidos por estreptozotocina tanto tratados com salina, quanto tratados com o extrato apresentaram aumento significativo da glicemia de jejum quando comparados aos grupos controle (CTLSAL e CTLEXT), confirmando o estabelecimento do diabetes. O grupo STZEXT, após sete dias de tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla*, apresentou diminuição dos níveis de glicemia de jejum de 35% e 40,5% no 15º dia de tratamento quando comparado ao grupo STZSAL. Não houve diferença significativa entre os grupos CTLSAL e CTLEXT (Figura 6).

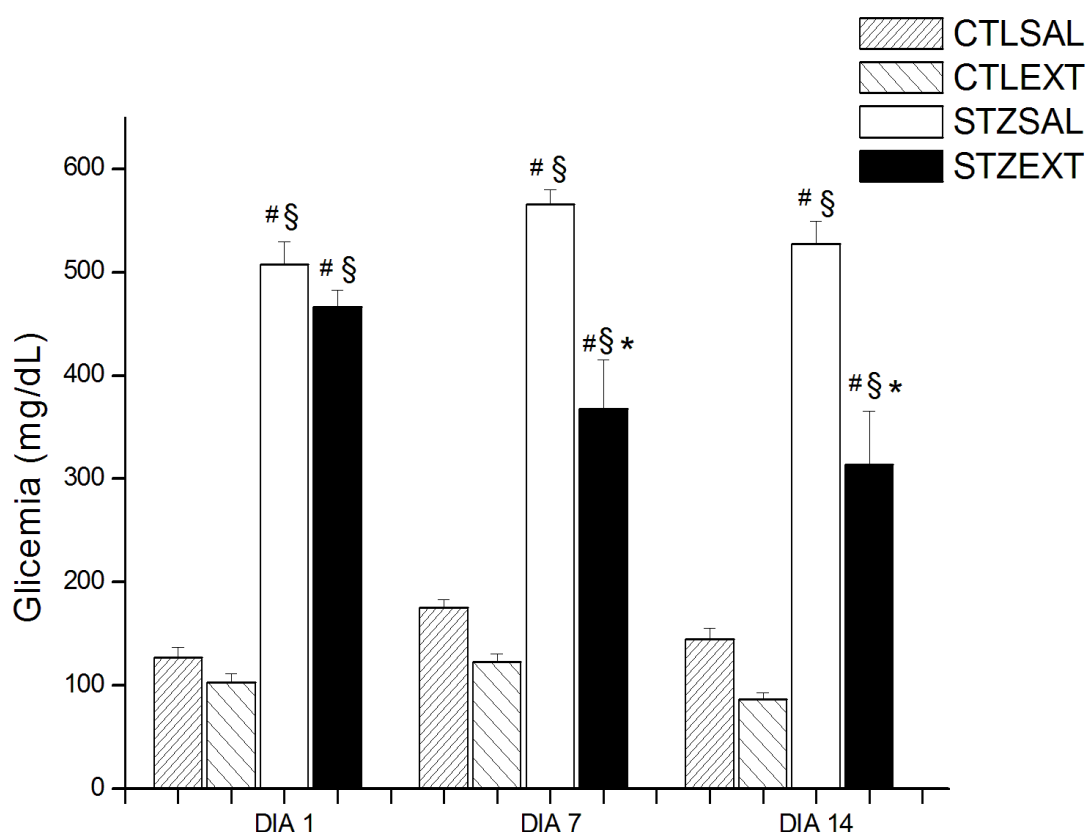


Figura 6: Glicemia de jejum (mg/dL) de animais normoglicêmicos controle e diabéticos tratados com salina (CTLSAL e STZSAL) e normoglicêmicos e diabéticos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* com uma dose de 400 mg/kg durante 15 dias (CTLEXT e STZEXT). # vs. CTLSAL, § vs. CT CTLEXT e * vs. STZSAL. Valores expressos como média ± EPM, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.3. GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR

Os níveis de glicogênio hepático nos animais diabéticos tratados com salina (STZSAL) apresentaram diminuição em relação ao grupo CTLSAL e CTLEXT ($p < 0,05$). No entanto, após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla*, os níveis do grupo STZEXT aumentaram, ficando inclusive, iguais aos dos grupos CTLSAL e CTLEXT não apresentando diferença significativa (Figura 7). Os grupos STZSAL e STZEXT apresentaram redução significativa dos níveis de glicogênio muscularem relação ao grupo CTLEXT (Figura 8).

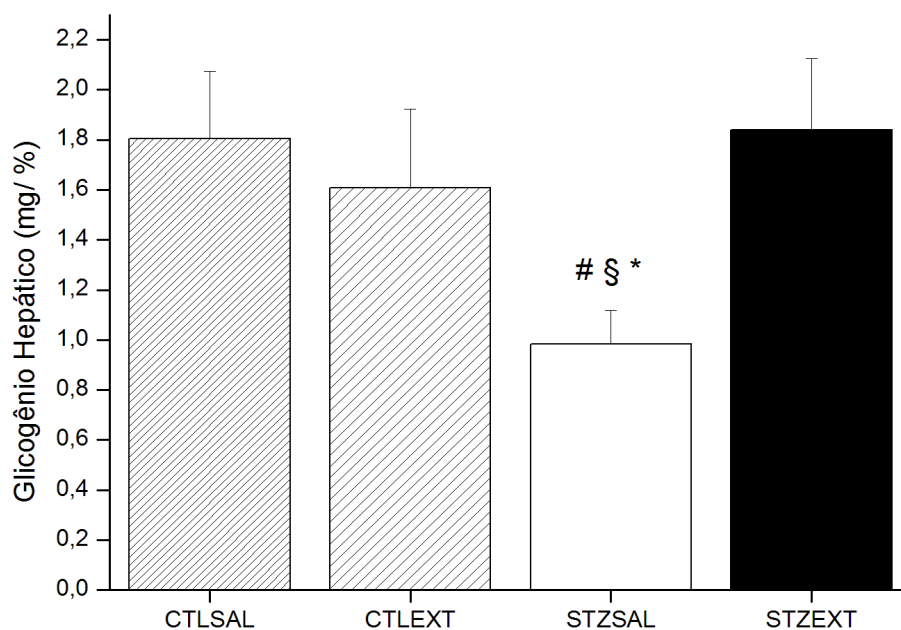


Figura 7: Conteúdo de glicogênio hepático (mg/%) dos animais normoglicêmicos controle e diabéticos tratados com salina ou tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT e * vs. STZEXT. Valores expressos em média $\pm$ SE, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

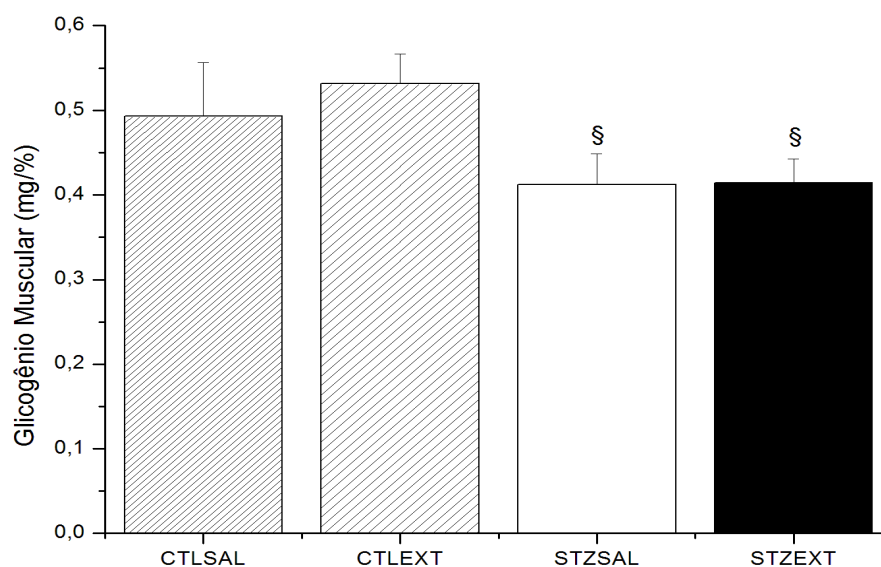


Figura 8: Conteúdo de glicogênio muscular (mg/%) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. § vs. CTLEXT. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.4. TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE INTRAPERITONEAL (ipGTT)

A glicemia no grupo STZSAL foi maior em todos os tempos em comparação aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZEXT ($p<0,001$). Os diabéticos tratados com o extrato de *B. holophylla* no tempo 0 apresentaram glicemia significativamente maior em relação aos grupos controles. No entanto, após 15 minutos da injeção da solução de glicose, apresentaram menor elevação da glicemia grupo STZSAL. A partir do minuto 60, a glicemia do grupo STZEXT foi significativamente menor que o grupo STZSAL ($p<0,05$) (Figura 9 e Tabela 2).

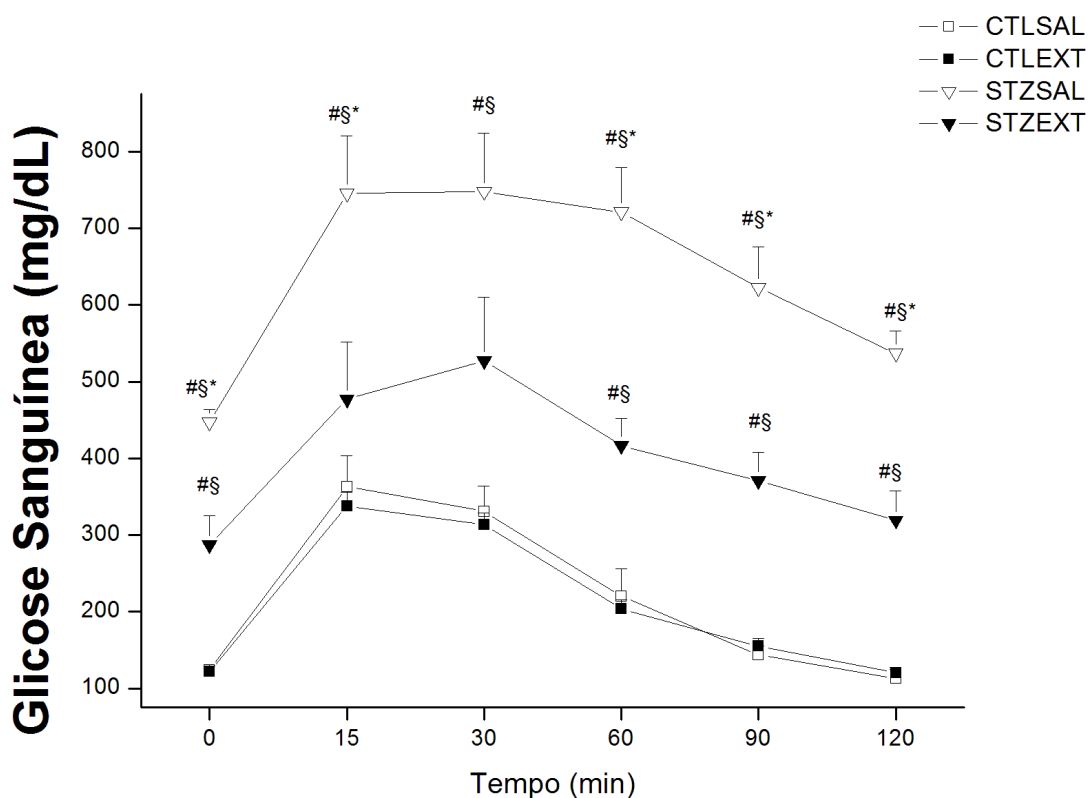


Figura 9: Teste de tolerância à glicose dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL; § vs. CTLEXT; * vs. STZEXT. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p<0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

Tabela 2: Efeito da administração do extrato de *B. holophylla* no teste de tolerância à glicose (ipGTT) após a administração intraperitoneal de glicose (2g/kg).

TEMPO (MIN)	CTLSAL	CTLEXT	STZSAL	STZEXT
0	124,14 ± 5,2	121,9 ± 7	447 ± 17,2#§*	287,4 ± 37,5#§
15	363 ± 40,4	337,8 ± 18	745,8 ± 75#§*	477,1 ± 74,4#§
30	330,7 ± 32,6	313,3 ± 15,3	747,2 ± 76#§	527, 5 ± 82,6#§
60	220, 4 ± 35,7	203,5 ± 11,6	721 ± 53,1#§*	416, 8 ± 35,4#§
90	143,6 ± 11,8	155 ± 6,6	622,4 ± 53#§*	370, 7 ± 37#§
120	113,3 ± 11,8	120 ± 18,9	537 ± 29,3#§*	319 ± 38,6#§

CTLSAL – animais normoglicêmicos tratados com salina, CTLEXT – animais normoglicêmicos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c., STZSAL – animais diabéticos tratados com salina, STZEXT – animais diabéticos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. # vs. CTLSAL; § vs. CTLEXT; * vs. STZEXT. Valores expressos como média ± EPM, p<0,05, n=8. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

Esses resultados podem ser melhor analisados na Figura 10, área sob a curva, onde podemos observar a constante de decaimento da glicemia em cada grupo. Como pode ser visto, o grupo STZEXT apresentou resultados similares aos do grupo CTLSAL e CTLEXT, não havendo diferença significativa entre eles, enquanto o grupo STZSAL mostrou diminuição da constante de decaimento da glicemia mostrando ser intolerante à glicose (p<0,0001).

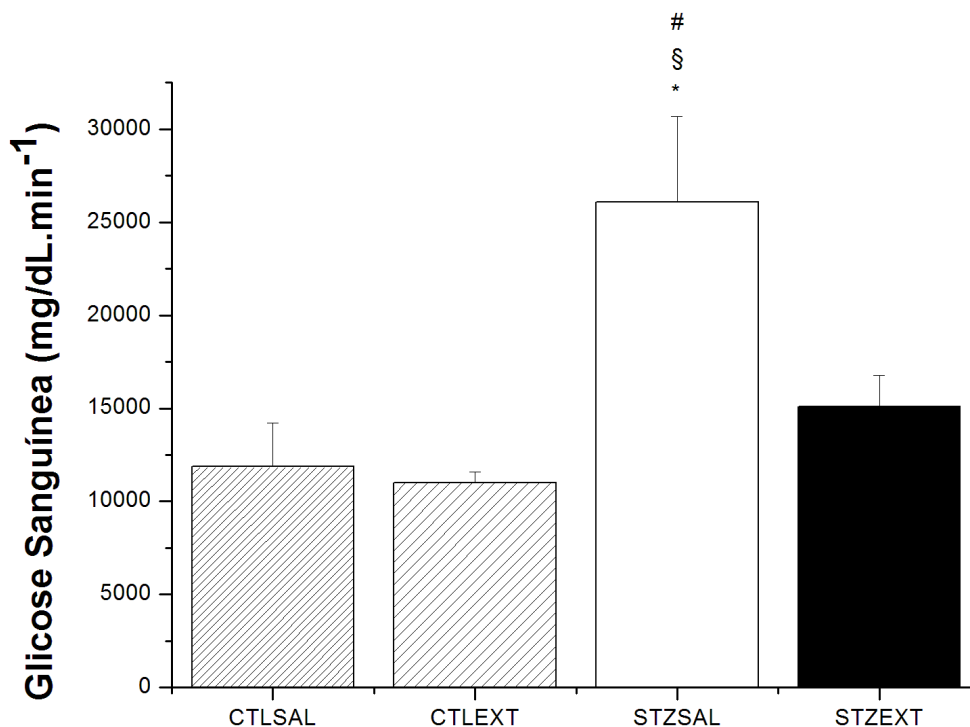


Figura 10: Área sob a curva dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs CTLSAL; § vs. CTLEXT; * vs. STZEXT. Valores expressos em média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.5. AVALIAÇÃO DO PESO CORPÓREO

Ao avaliarmos o peso corpóreo dos animais, foi constatada redução significativa do peso corpóreo dos animais diabéticos tratados com salina (STZSAL) em comparação aos animais dos grupos controle (CTLSAL e CTLEXT) (Figura 11). O grupo diabético tratado com o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante quinze dias apresentou redução da perda de peso corpóreo em comparação ao grupo STZSAL ($p < 0,05$).

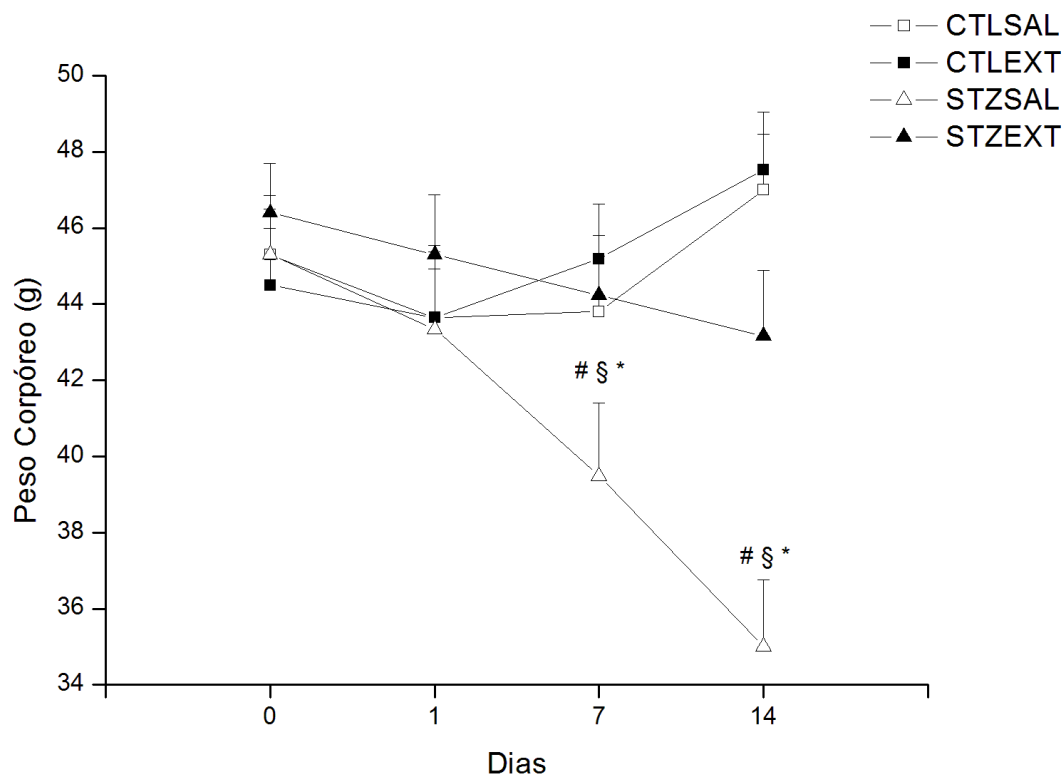


Figura 11: Avaliação do peso corpóreo dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT e * vs. STZEXT. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.6. AVALIAÇÃO DO PESO DOS ÓRGÃOS

Após o tratamento de quinze dias, os grupos STZSAL e STZEXT apresentaram aumento do peso do fígado e rins e redução da gordura epididimal quando comparados ao grupo CTLEXT. Não foram encontradas gordura retroperitoneal e intraperitoneal nos grupos STZSAL e STZEXT (Tabela 3).

Tabela 3: Pesos dos órgãos (g/kg peso corpóreo)

	FIGADO	BAÇO	GASTROCNÊMIO	RINS	GORDURA EPIDIDIMAL
CTLSAL	42,4 ± 1,8	3,7 ± 0,3	7,8 ± 0,4	12,7 ± 0,6	33,2 ± 3,8
CTLEXT	38,3 ± 0,9	3 ± 0,1	7 ± 0,6	10,7 ± 0,3	24,6 ± 2,1
STZSAL	48,6 ± 1,7§	2,8 ± 0,3	7,3 ± 0,4	14,5 ± 0,7§	1,6 ± 0,2#§
STZEXT	47 ± 2§	2,6 ± 0,9	6,2 ± 0,5	14,1, ± 0,7§	0,7 ± 0,2#§

CTLSAL – animais normoglicêmicos tratados com salina, CTLEXT- animais normoglicêmicos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c., STZSAL – animais diabéticos tratados com salina, STZEXT – animais diabéticos tratados com extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. § Diferença significativa vs. CTLEXT; # vs. CTLSAL, $p < 0,01$, $n=8$. Valores expressos como média ± EPM. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.7. PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

O grupo STZEXT apresentou diminuição dos níveis de TG (Figura 12) após o tratamento com o extrato de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. quando comparado aos grupos STZSAL e CTLSAL, como também dos níveis de T-Col (Figura 13) em relação aos grupos STZSAL e CTLEXT. Os grupos CTLSAL, CTLEXT e STZSAL não apresentaram diferença estatística entre si. Com relação às proteínas totais, os animais não apresentaram diferença significativa entre si. Os níveis de proteínas totais não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 14).

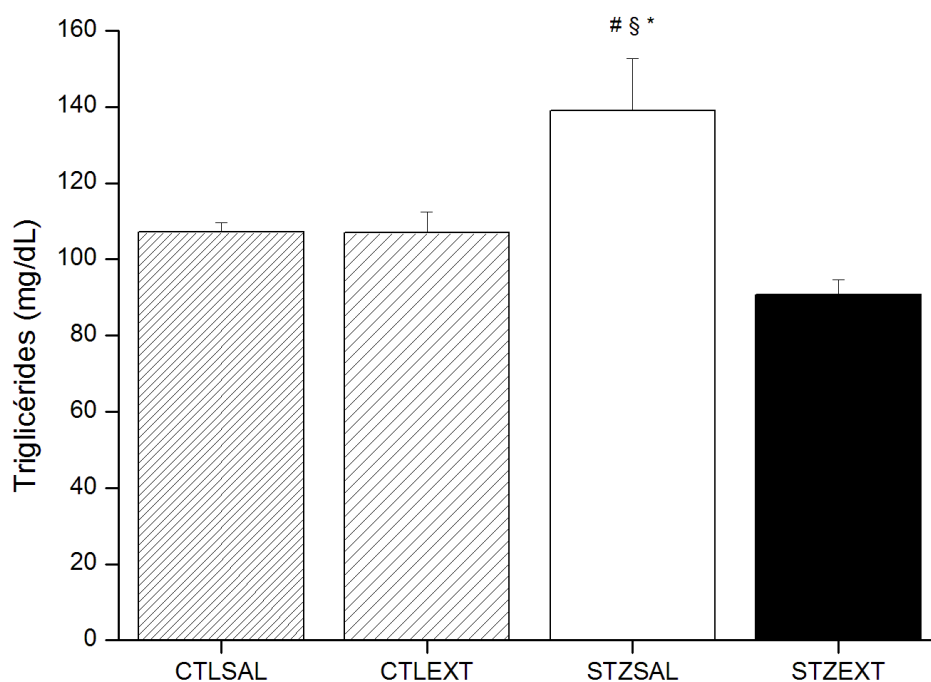


Figura 12: Triglicérides (mg/dL) dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT, * vs. STZSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

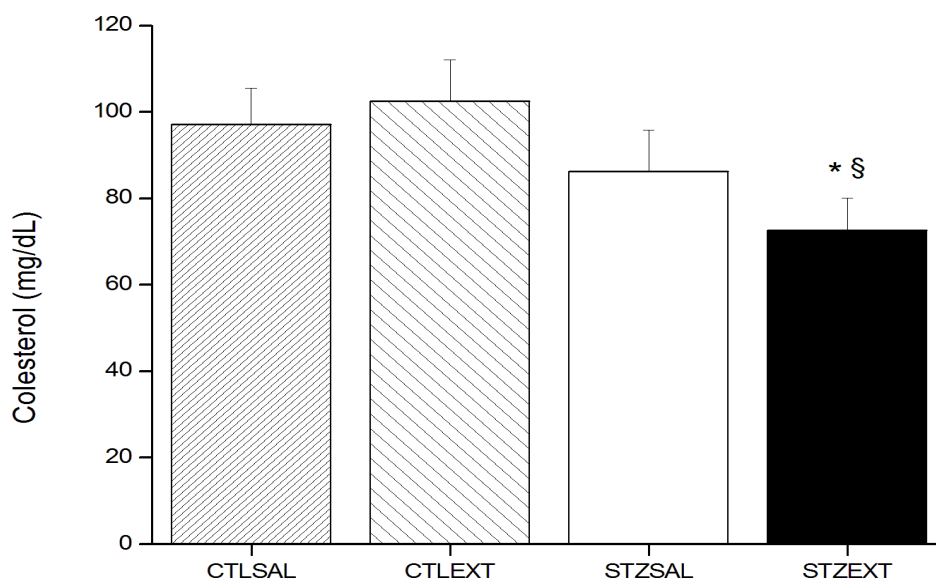


Figura 13: Colesterol Total (mg/dL) dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. § vs. CTLEXT, * vs. STZSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

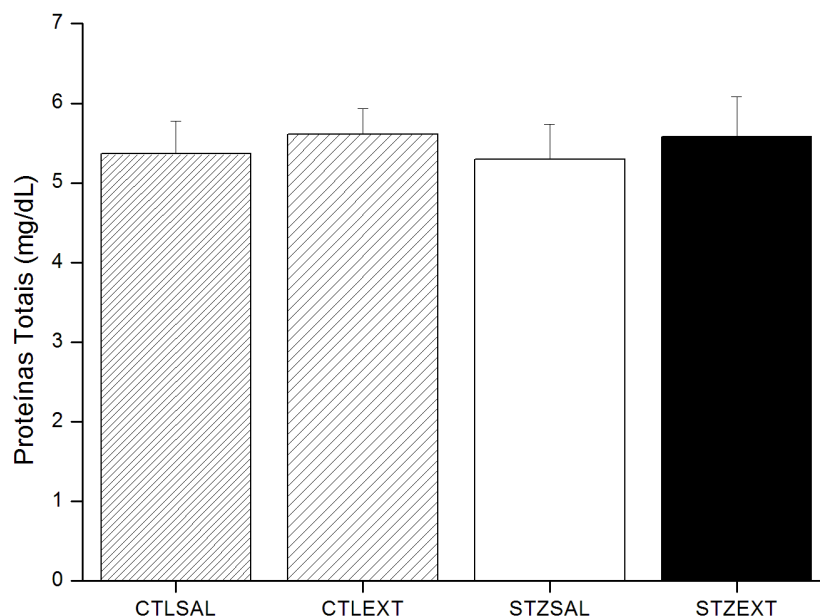


Figura 14: Proteínas Totais (mg/dL) em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.8. INGESTÃO HÍDRICA E ALIMENTAR

Durante os 15 dias tratamento, foram mensuradas a ingestão hídrica e alimentar dos animais diariamente. Os grupos CTLSAL e CTLEXT não apresentaram diferença entre si. Já os grupos STZSAL e STZEXT mostraram expressivo aumento da ingestão de água e ração quando comparados ao grupo CTLSAL e CTLEXT. No entanto, o grupo STZEXT apresentou diminuição da ingestão em relação ao grupo STZSAL (Figuras 15 e 16).

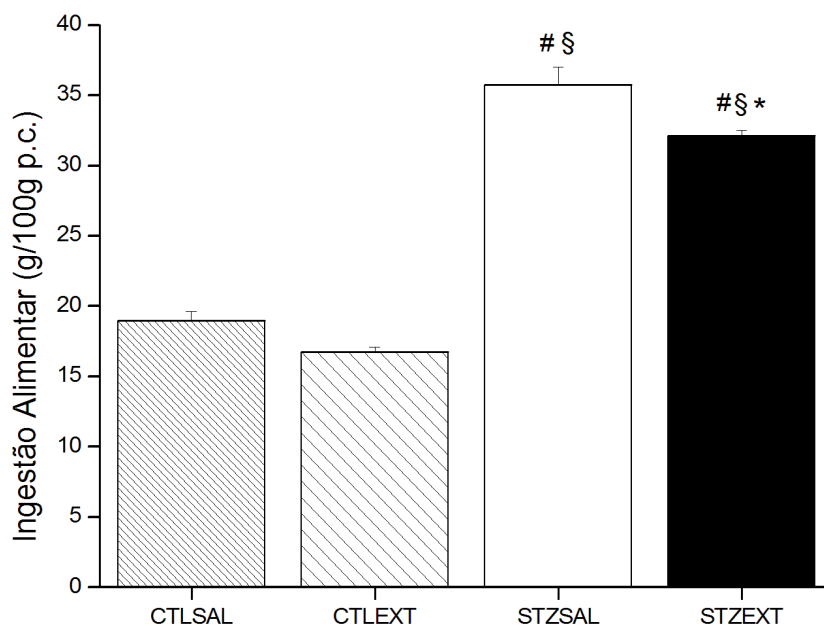


Figura 15: Ingestão alimentar dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT, * vs. STZSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

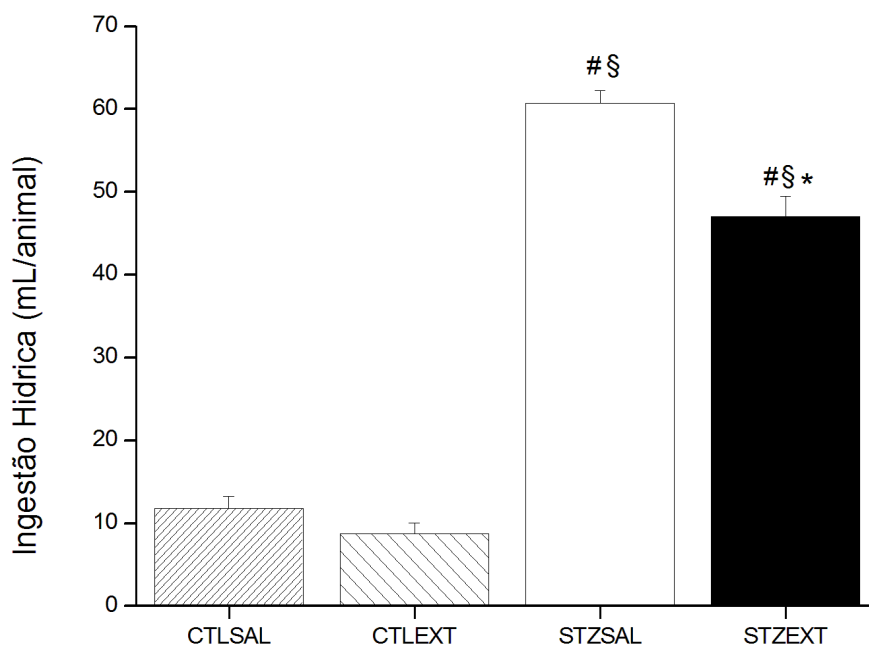


Figura 16: Ingestão hídrica dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT, * vs. STZSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.9. EXPRESSÃO PROTEÍCA POR WESTERN BLOTT

A expressão da proteína PI3K na forma total (Figura 17) não apresentou diferença significativa entre os grupos, mostrando que será necessário avaliar também a proteína na sua forma fosforilada, que é a forma ativa da proteína.

Já a relação p-AKT/AKT (Figura 18) apresentou aumento significativo no grupo STZEXT em relação ao grupo STZSAL ($p<0,01$). A expressão proteica da enzima glicogênio sintetase (Figura 19) também mostrou aumento no grupo STZEXT em relação ao grupo STZSAL ($p<0,01$).

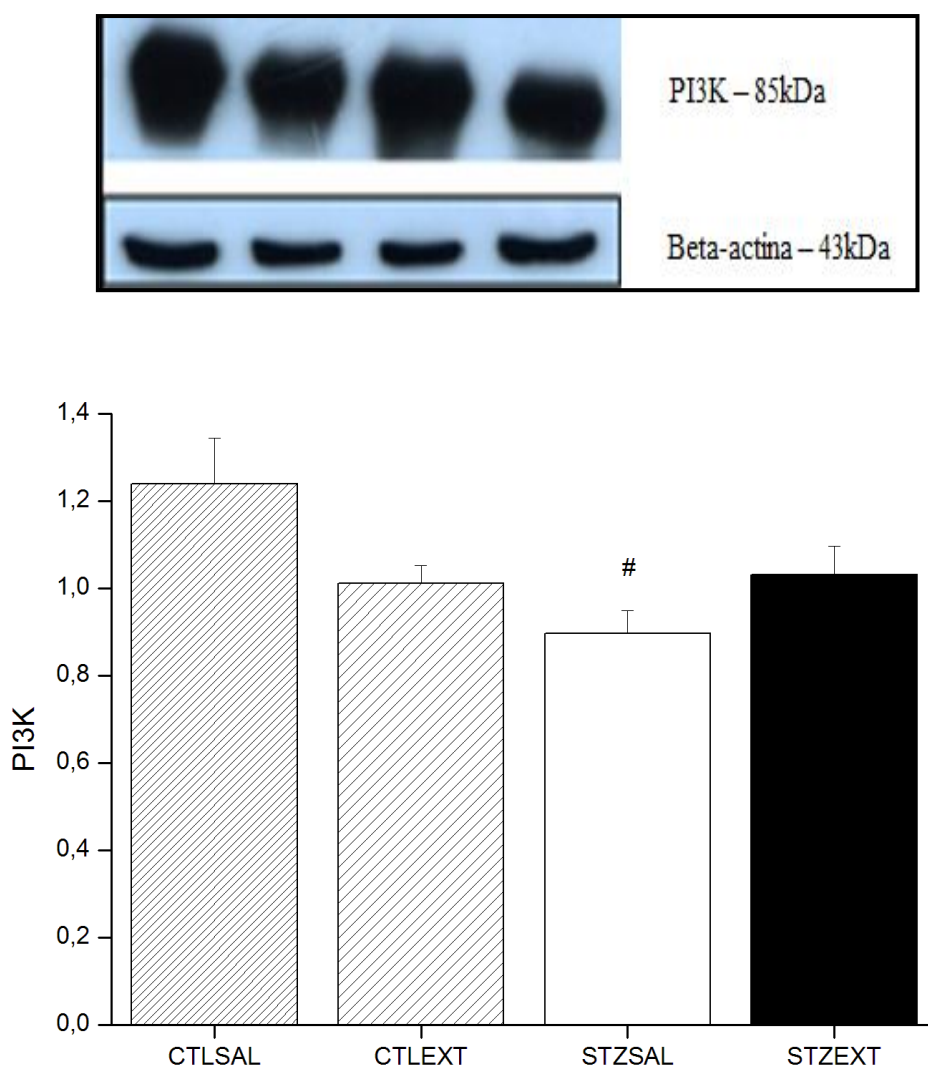


Figura 17: Expressão proteica de PI3K em fígado em animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p<0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de post test Tukey.

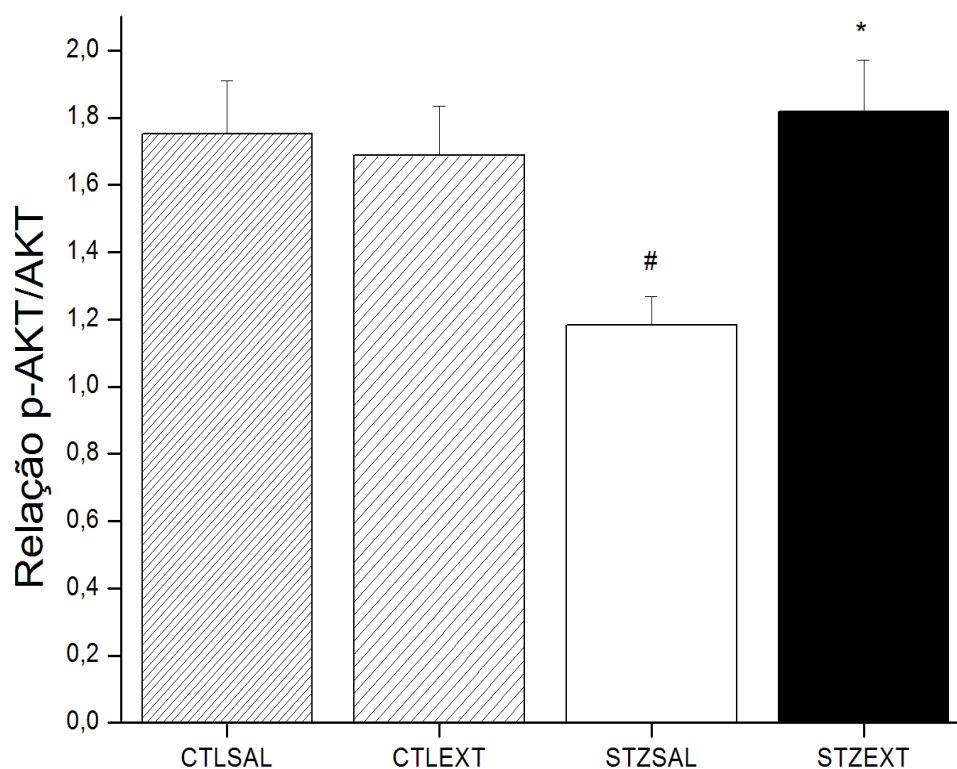
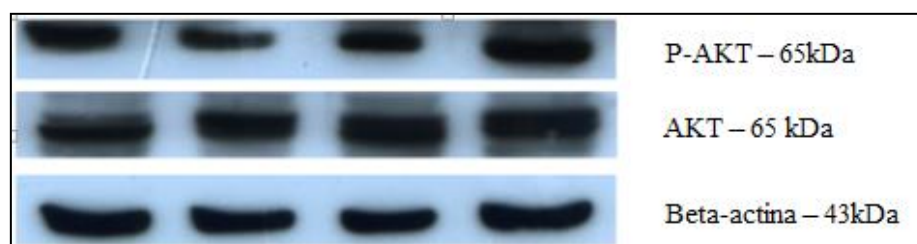


Figura 18: Expressão proteica da AKT em fígado dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. Os resultados indicam a relação entre a forma fosforilada e total. # vs. CTLSAL, * vs. STZSAL. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

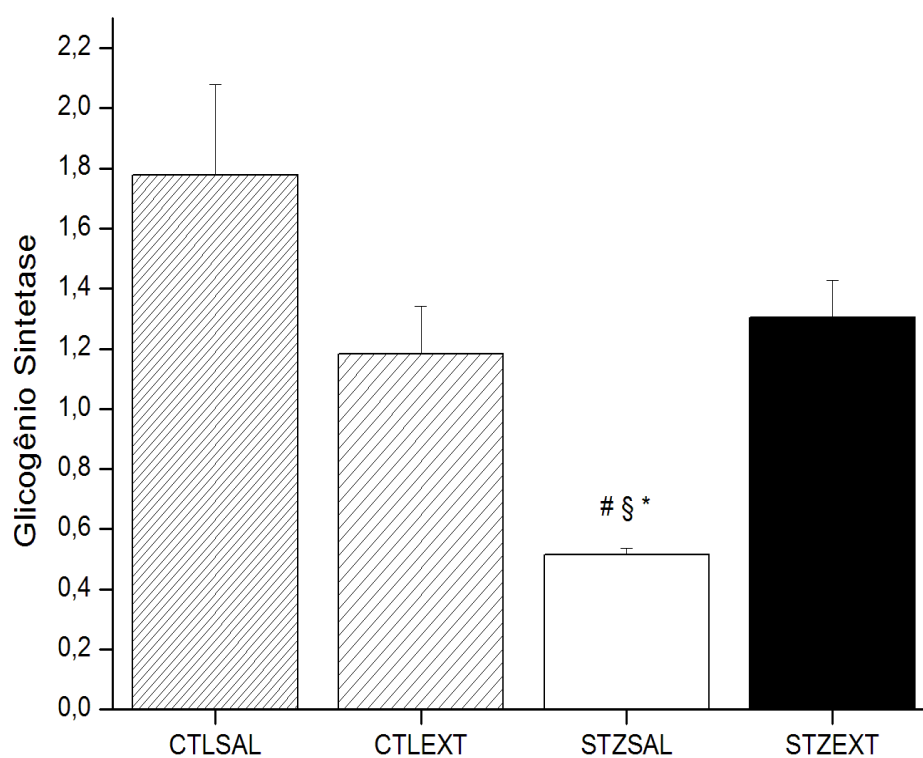


Figura 19: Expressão proteica da GS em fígado dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg p.c. durante 15 dias. # vs. CTLSAL, § vs. CTLEXT, * vs. STZEXT. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

6. *DISCUSSÃO*

O uso de plantas medicinais no tratamento de doenças é feito há muito tempo pela humanidade. No Brasil e no mundo, a fitoterapia foi a peça essencial do arsenal terapêutico até meados do século XIX (CARVALHO, 2004; GHOUL et al., 2012). Com o passar dos anos, o uso de plantas medicinais foi perdendo espaço e passaram a ser utilizadas apenas na medicina alternativa. No entanto, nos dias atuais, houve um crescimento do interesse por parte da comunidade científica em relação às plantas medicinais para comprovação do que se conhece empiricamente sobre a ação desses fitoterápicos no tratamento de diversas doenças, como o diabetes (SILVA & CECHINEL, 2002), doença que se torna a cada ano um grande problema de saúde pública, pois o número de pessoas diabéticas só tem aumentado, bem como o número de mortes em virtude das complicações decorrentes da hiperglicemia (BANSAL et al., 2012; KUMAR et al., 2012). Atualmente, para o tratamento do DM recorre-se à insulinoterapia e administração de drogas hipoglicemiantes, que agem diminuindo a glicemia através de inúmeros mecanismos. Tais mecanismos incluem aumento da sensibilidade à insulina pelos tecidos periféricos, estímulo da secreção de insulina, inibição da absorção de glicose intestinal (HSU et al., 2009). No entanto essas drogas possuem muitos efeitos adversos, como ganho de peso, hipoglicemia, edemas, distúrbios gastrointestinais e resistência à insulina (ANDRADE - CETTO et al., 2010; KUMAR et al., 2012).

A partir disso, a busca por agentes que possam ter menos efeitos adversos tornou-se alvo de pesquisa. É nesse âmbito que as plantas medicinais têm se tornado alvo da comunidade científica para o desenvolvimento de novos fármacos com menos efeitos adversos. Sabe-se que as plantas possuem princípios ativos que são capazes de diminuir a glicose sanguínea e melhorar o quadro de diabetes, demonstrando resultados promissores para a formulação de novos fármacos (GUPTA et al., 2008).

Desse modo, determinados pela busca de novos fármacos, esse trabalho teve por objetivo avaliar a possível atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Bauhinia holophylla*, uma planta proveniente do cerrado brasileiro e muito utilizada na medicina popular, bem como seus possíveis mecanismos de ação e a sua toxicidade.

Com o interesse de verificar a possível toxicidade do extrato bruto de *B. holophylla*, inicialmente realizamos o teste de toxicidade aguda, que tem por objetivo avaliar possíveis alterações comportamentais, disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor e reflexo e atividades sobre o sistema nervoso central e autônomo. Foi realizado através da administração de uma única dose alta (2000 mg/kg p.c) do extrato para avaliação do

“screening” hipocrático que fornece uma avaliação completa a respeito da toxicidade da substância sobre a disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor e reflexo do animal. Análises do peso corporal e peso dos órgãos podem fornecer dados importantes acerca da saúde geral do animal (MALONE; ROBICHAUD, 1983).

O teste de toxicidade não mostrou alterações comportamentais e motoras referentes ao “screening” hipocrático. Durante os quatorze dias de observação, não houve morte dos animais do grupo tratado com o extrato de *B. holophylla*, e não ocorreram também alterações significativas no peso corpóreo e nem no peso dos órgãos dos animais tratados com o extrato bruto de *B. holophylla*. Tais dados são de extrema importância, pois mostram que a administração de uma dosagem alta do extrato foi considerada segura, pois não causou alterações na coordenação motora como também não causou alterações no peso de órgãos. O estudo toxicológico é de suma importância para a transição da medicina tradicional para a obtenção de novos fármacos (KABORE et al., 2010).

A hiperglicemia é resultado de defeitos na ação e/ou diminuição da secreção de insulina (PRABHAKAR & DOBLE, 2011). A estreptozotocina tem sido amplamente utilizada para a indução do diabetes experimental em roedores devido à reprodução dos sintomas característicos do diabetes, uma vez que apresentam semelhanças clínicas, histológicas e laboratoriais com humanos diabéticos. A administração da STZ causa a morte das células β e algumas horas após a injeção, os animais apresentam hiperglicemia e hiperinsulinemia, com posterior hipoglicemia transitória, e finalmente hiperglicemia crônica característica do DM (KIRSTEN, 2010).

O modelo experimental de diabetes utilizado nesse trabalho comprovou a eficácia da administração de STZ, visto o aumento da glicemia (400 mg/dL) de jejum dos animais do grupo STZSAL e STZEXT em comparação aos animais normoglicêmicos (CTLSAL e CTLEXT). Com a administração do extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante quinze dias, os animais tratados apresentaram diminuição significativa (cerca de 35%) da glicemia de jejum logo sete dias após o início do tratamento, mantendo-se diminuída (40%) até o final de quinze dias em comparação ao grupo STZSAL, mostrando que o extrato possui atividade hipoglicemiante. Como dito anteriormente, a hiperglicemia decorrente do DM tipo 1 deve-se à diminuição da secreção de insulina e/ou diminuição da sua ação. A capacidade das plantas medicinais em modular o metabolismo de glicose e diminuir a glicemia pode ocorrer através de mecanismos como a diminuição da produção de glicose

hepática, bem como da estimulação da síntese de glicogênio, principal reserva de glicose do nosso organismo.

O órgão “chave” responsável pelo processo de estocagem de glicose na forma de glicogênio (glicogênese) é o fígado, e tal processo só ocorre na presença de insulina. Em situações como o DM, e consequente ausência da insulina, o fígado fica incapacitado de realizar a glicogênese e intensificam-se processos como gliconeogênese e glicogenólise. Isso foi demonstrado em nossos resultados, após a indução do diabetes. Os níveis de glicogênio hepático dos animais diabéticos tratados com salina tiveram diminuição significativa em relação aos grupos CTLSAL e CTLEXT. Em contrapartida, os animais diabéticos tratados com o extrato bruto de *B. holophylla* apresentaram o conteúdo de glicogênio hepático igual aos dos animais normoglicêmicos. Isso mostra que o extrato agiu estimulando a glicogênese e/ou inibindo processos como glicogenólise, mesmo na ausência da insulina. O mesmo não ocorreu no conteúdo de glicogênio muscular, pois não houve diferença significativa entre os grupos e, portanto, não se pode afirmar que a diminuição da glicemia tenha ocorrido pelo aumento da captação de glicose pelo músculo.

Alguns estudos com compostos isolados de plantas, mostram atividade hipoglicemiante através da estimulação da síntese de glicogênio, como foi demonstrado por Liu et. al (2010). Foi comprovado que a Berberina (BBR), presente em muitas espécies de plantas como Guduchi (*Tinospora cordifolia* - Willd) proveniente da Índia, foi capaz de estimular glicogênese através da ativação da Akt, principal proteína responsável por mediar o metabolismo de carboidratos.

O teste de tolerância à glicose (ipGTT) é um método de referência para o diagnóstico de diabetes ou de intolerância à glicose, no caso da glicemia não retornar à concentração basal ou apresentar-se maior que 200 mg/dL para humanos após duas horas da administração da glicose (GROSS et al., 2002). Em nossos resultados, o ipGTT confirmou o estado de intolerância à glicose no grupo STZSAL, confirmando a instalação do quadro de diabetes, visto que a glicemia não retornou aos níveis basais como observado nos grupos normoglicêmicos. Já o grupo diabético tratado com o extrato bruto de *B. holophylla* apresentou resultados similares aos dos grupos CTLSAL e CTLEXT, mostrando que o tratamento melhorou a tolerância à glicose.

Diante desses resultados, fizemos uma investigação em nível molecular, avaliando a expressão de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina por técnica de Western Blott. Uma vez que houve diminuição da glicemia de jejum nos animais do grupo

STZEXT, foram analisadas proteínas envolvidas no armazenamento de glicose da via Akt/PI3K no tecido hepático. Essa via está envolvida no metabolismo de glicose mediado pela insulina, sendo uma, senão a mais importante via desse processo. A partir da ativação da PI3K pelo receptor de insulina (IR) ocorre uma cascata de eventos que após interação proteína-proteína culmina nas ações metabólicas da insulina. Após avaliação da expressão de proteínas como AKT e GS e suas formas fosforiladas, ficou evidente a ação da administração do extrato bruto de *B. holophylla* em estimular essa via que, na ausência de insulina, se torna inativa. A proteína PI3K quando ativada pela insulina, leva à ativação e fosforilação da Akt, que uma vez a forma fosforilada é responsável por ativar o processo de glicogênese e inibir os processos degradativos como neoglicogênese e glicogenólise. A Akt tem sua ação no armazenamento e inibição dos processos degradativos através do aumento ou diminuição na transcrição de genes e enzimas envolvidos em tais processos. Após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* em animais diabéticos (STZEXT) ocorreu aumento da expressão das proteínas AKT e GS em relação aos animais diabéticos tratados com salina (STZSAL). A expressão da proteína PI3K não demonstrou aumento em relação ao grupo STZEXT. Com esses resultados, podemos inferir que o extrato estimulou a síntese de glicogênio hepático através da ativação das proteínas envolvidas na via e com consequente diminuição da glicemia dos animais tratados.

Além da hiperglicemia, o DM tem outros sintomas clínicos como aumento da ingestão alimentar (polifagia) e hídrica (polidipsia) (ADA, 2011). A sede intensa deve-se ao aumento da osmolaridade sanguínea devido aos altos níveis de glicose no sangue, fazendo a água passar do meio intracelular para o extracelular, para manter o equilíbrio osmótico. Essa desidratação intracelular é percebida pelos osmorreceptores cerebrais, levando a sede intensa (LERCO, et al., 2003). Após a indução do diabetes, os animais do grupo STZSAL e STZEXT apresentaram aumento da ingestão hídrica em relação aos grupos controles. No entanto, o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* levou à diminuição significativa da ingestão em comparação ao grupo diabético tratado somente com salina, possivelmente ocasionado pelo reequilíbrio osmótico, uma vez que houve diminuição da glicemia sanguínea. O aumento da ingestão alimentar está relacionado a distúrbios nos processos de regulação da fome pelo centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que necessita de insulina para captação da glicose. Após a captação da glicose, o centro da fome é inibido. No entanto, no diabetes não há captação de glicose, e o centro da fome não é inibido, levando à maior ingestão alimentar (JACOBSON, 1996). Os animais induzidos ao diabetes tiveram

aumento da ingestão alimentar em relação aos grupos controles. No entanto, o grupo diabético tratado com o extrato bruto de *B. holophylla* apresentou redução da polifagia quando comparado ao grupo diabético tratado com salina (STZSAL).

Outro sintoma clínico do diabetes e que pode ser observado no modelo experimental escolhido nesse trabalho, é a acentuada perda de peso nos animais diabéticos que é ocasionada principalmente pela intensa proteólise de proteínas estruturais, responsáveis pela rigidez, consistência e elasticidade dos tecidos e também devido ao aumento da lipólise. Tais processos ocorrem devido à ausência da insulina que é o hormônio responsável por regular o metabolismo de carboidratos e estimular a síntese de proteínas, além de ser responsável pela formação e armazenamentos de lipídeos (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002). Por isso, na ausência da insulina, estão aumentados processos como proteólise e lipólise, o que contribui para a perda de peso. O grupo diabético tratado com salina (STZSAL) mostrou acentuada perda de peso nove dias após o início do tratamento em relação aos demais grupos. O mesmo não ocorreu com os animais diabéticos tratados com o extrato bruto de *B. holophylla* (STZEXT) que apresentou menor perda peso corpóreo quando comparado com o grupo diabético tratado com salina.

A insulina também é responsável por inibir a lipólise e estimular a lipogênese nos adipócitos (CHOI et al., 2010), além de estimular a síntese de ácidos graxos no fígado em períodos de excesso de carboidratos (ZECHIN; CARVALHEIRA & SAAD, 2004). No entanto, na ausência ou ineficiência da insulina, esses processos ficam impedidos de ocorrer e, com isso, ocorre aumento dos níveis de triglicerídeos plasmáticos, provavelmente pela elevada síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado devido à maior lipólise no tecido adiposo (CARVALHEIRA; ZECHIN & SAAD, 2002). Como resultado, ocorre intensa síntese de VLDL hepática acompanhada de menor catabolismo da mesma devido à menor atividade de lipase lipoproteica (JAIN; RAINS & CROAD, 2007). Observa-se em indivíduos diabéticos, aumento da lipólise no tecido adiposo, com elevação dos níveis de ácidos graxos e maior produção de corpos cetônicos pelo fígado (FORETZ et al., 1999). Embora os mecanismos moleculares que expliquem como isso ocorre ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que a desregulação da homeostase de glicose e lipídeos, como o aumento da resistência à insulina, redução da oxidação de ácidos graxos, elevado fluxo de ácido graxo no fígado e lipogênese prejudicada, possuem um papel importante no desenvolvimento da esteatose hepática (KIM et al., 2009). Devido a isso, indivíduos com diabetes apresentam esteatose hepática, possuem elevados níveis de LDL e

VLDL e uma redução drástica dos níveis de HDL, apresentando sérias propensões ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como aterosclerose (LUDVIK, 2000). Drogas utilizadas no tratamento de diabetes, como metformina, combatem o acúmulo de gordura no fígado em roedores e em humanos por regular o metabolismo de lipídeos, através da ativação de uma proteína chamada AMPK, que é responsável por regular o metabolismo energético pela ativação da via geradora de ATP, como a glicólise e oxidação de ácidos graxos e por inibir a via consumidora de ATP como a síntese de colesterol e ácido graxo (KIM et al., 2009). A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução de sobrevida dos pacientes diabéticos, sendo a causa mais frequente de mortalidade, pois abrange grande variedade de distúrbios vasculares, incluindo infarto do miocárdio (LETHO et al., 1997). Cerca de 70 a 80% das mortes em pacientes diabéticos ocorrem devido a essas doenças (KUNJATHOOR; WILSON; LEBOEUF, 1996).

Muitos estudos com plantas medicinais têm revelado a capacidade das mesmas em modular as complicações derivadas do diabetes, através da diminuição da glicemia sérica, dos níveis de lipídeos e atuação como antioxidante (GHOUL et al., 2012). Alguns estudos realizados por Kumar et. al (2011) revelaram que a administração do extrato de *Dillenia indica* (L.) durante 21 dias na dose de 250 e 500 mg/kg p.c em ratos diabéticos induzidos por aloxana, foi capaz de diminuir os níveis de triglicérides e colesterol e aumentar significativamente os níveis de HDL. Outro estudo realizado por Ghoul et. al (2012) avaliou a atividade hipoglicemiante, hipolipidêmica e antioxidante do extrato *Zygophyllum album* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e viu-se que o extrato na dose de 300 mg/kg p.c. foi capaz de diminuir a glicemia de jejum, bem como os níveis de LDL, TC, TG, VLDL e aumentar os níveis de HDL, além de promover o aumento de enzimas antioxidantes.

No diabetes induzidos por STZ, assim como em humanos, a hiperglicemia é o maior determinante na alteração dos níveis totais de colesterol e triglicerídeos (KUNJATHOOR; WILSON & LEBOEUF, 1996). Em nosso trabalho, os animais diabéticos tratados com salina apresentaram aumento dos níveis de colesterol total e triglicérides, comprovando a hiperlipidemia característica do quadro. Já os animais do grupo STZEXT, após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* apresentaram redução significativa dos níveis totais de colesterol e triglicerídeos, mostrando uma possível atividade hipolipidêmica do extrato. Tal resultado é de suma importância, visto que distúrbios no metabolismo de lipídeos, como citado anteriormente, uma das complicações decorrentes à longa exposição à hiperglicemia, é uma das causas de doenças cardiovasculares.

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e seus possíveis mecanismos de ação. Diante dos resultados aqui apresentados, vimos que o extrato teve ação hipoglicêmica e hipolipidêmica, agindo em nível molecular na redução da glicemia. Tais resultados são de extrema relevância, visto a necessidade de estudos que incorporem novos fármacos hipoglicemiantes no mercado.

Para um melhor entendimento e compreensão destas atividades, o presente trabalho necessita de um estudo mais aprofundado a respeito dos mecanismos de ação do extrato bruto de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos, o que certamente envolve processos como gliconeogênese, glicogênese e glicogenólise em fígado. Além disso, estudos acerca da captação de glicose em tecidos periféricos devem ser executados.

7. CONCLUSÃO

A partir dos dados aqui apresentados pode-se concluir que o extrato bruto de *Bauhinia holophylla*, administrado na dose de 400 mg/kg p.c. em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, possui atividade hipoglicemiante através da modulação de proteínas envolvidas no metabolismo de glicose, envolvidas em sua captação e armazenamento no fígado. O extrato foi capaz de diminuir ainda os níveis de lipídeos, demonstrando atividade hipolipidêmica, melhorando assim as complicações advindas da exposição à hiperglicemia, e melhorando, portanto, o quadro de diabetes dos animais tratados. Tais resultados nos estimulam a aprofundar nossos estudos com o intuito de melhor entender os mecanismos de ação e as propriedades medicinais do extrato bruto de *Bauhinia holophylla*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKRAM, M. ASLF, H.M.; AKHTAR, N.; SHAH, P.A.; UZALR, M.; SHAHEEN, G.; SHAMIM, T.; SHAH, S.M.; AHMAD, K. Glycogen metabolism and glycogen storage diseases: A Review. **Journal of medicinal plants research**. v. 5, p. 4980-4983, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.S62-S69, 2011.

ANDRADE – CETTO, A.; VÁSQUEZ, R. C. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. **J Ethnopharmacol**. v. 130, p. 93-97, 2010.

BANSAL, P.; PAUL, P.; MUDGAL, J.; NAYAK, P.G.; PANNAKAL, S.T.; PRIYADARSINI, K.I.; UNNIKRISHNAN, M.K. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 64, p. 651-658, 2012.

BASTAKI, S. Diabetes mellitus and its treatment. **Int J Diabetes & Metabolism**. v. 13, p. 111-134, 2005.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP; Rio de Janeiro: Ed. Três, 1994. p.15-50.

BRYANT, N. J., GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**., v. 3, p. 267–277, 2002.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios. **Tecmed Editora**, p. 14-20, 2004.

CHOI, S.M.; TUCKER, D.F.; GROSS, D.N.; EASTON, R.M.; DIPILATO, L.M.; DEAN, A.S.; MONKS, B.R.; BIRNBAUM, M.J. Insulin regulates adipocyte lipolysis via AKT-independent signalling pathway. **Molecular and cellular biology**. v. 21, p. 5010-5020, 2010.

DA SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova**. v. 25 (3), p. 449-454, 2002.

DA SILVA, M.A.B.; MELO, L.V.L.; RIBEIRO, R.V.; SOUZA, J.P.M.; LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SILVA, R.M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** , v. 20 (4), p. 549-562, 2010.

DIAS, S.L.; MACIEL, T.R.C.; SABLICH, G.M. Diabetes tipo 2 na infância: revisão de literatura. **Con.Scientiae Saúde**, v. 6 (1), p. 71-80, 2007.

ESTRADA, O.; HASEGAWA, M.; GONZALES-MUJICA, F.; MOTTA, N.; PEDORMO, E.; SOLORZANO, A.; MENDEZ, J.; MENDEZ, B.; ZEA, G. Evaluation of flavonoids from

Bauhinia megalandra Leaves as inhibitors of glucose-6-phosphatase system. **Phytoter. Res.** v. 19, p. 859-863, 2005.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 1237-42, 1999.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo Multidisciplinar. **Multiciência**, v. 7, 2006.

FUENTES, O.; ARANCIBIA-AVILA, P.; ALARCON, J. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. **Fitoterapia**. v. 75, p. 527-532, 2004.

GHOUL, J.E.; SMIRI, M.; GHRAB, S.; BOUGHATTAS, N.A.; Attia, M.B. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antioxidant activities of traditional aqueous extract of *Zygophyllum album* in streptozotocin diabetic mice. **Pathophysiology**. v. 19, p.35-42, 2012.

GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A.H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **FITOTERAPIA**, v. 74, p., 84-90, 2003.

GROSS, J.L. Diabetes Mellito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia, v.46, n.1, 2002.

GUPTA, K.R.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A. K.; MAITHANI, M.; SINGH, R.; Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **J of Ethnopharmacol**. v. 139, p 801 – 806, 2012.

HAZARIKA, R.; PARIDA, P.; NEOG, B.; YADAV, R.N.S. Binding energy calculation of GSK-3 protein of Human against some anti-diabetic compounds of *Momordica charantia* Linn (Bitter melon). **Bioinformation**. v. 8, p. 251-254, 2012.

HSU, Y.J.; LEE, T. H.; CHANG, C.L.T. Anti-hyperglycemic and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 122, p. 379- 383, 2009.

JACOBSON, A.M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal Medicine**, v. 334, p. 1249-1253, 1996.

JAHROMI, M.M.; EISENBARTH, G.S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cell.Mol.Life Sci**, v.64, p. 865-872, 2007.

JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin,

triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 1124-31, 2007.

JENSEN, T.E. & RICHTER, E.A. Regulation of glucose and glycogen metabolism during and after exercise. **J Physiol**. v. 590, p. 1069-1076, 2012.

JOHANSEN, K. Efficacy of metformin in the treatment of NIDDM: meta-analysis. **Diabetes Care**. v. 22, p. 33-7, 1999.

KABORE, A.; TAMBOURA, H.H.; TRAORE, A.; TRAORE, A.; MEDA, R.; KIENDREBEOGO, M.; BELEM A.M.G. Phytochemical analysis and acute toxicity of two medicinal plants (*Anogeissus leiocarpus* and *Daniellia oliveri*) used in traditional veterinary medicine in Burkina Faso. **Schol. Res. Library**. v. 2, nº 6, p. 47-52, 2010.

KIRSTEN, V.R.; SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D. Modelos experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. **Medicina (Ribeirão Preto)**. v. 43, p. 3-10, 2010.

KUMAR, S.; LIANG, F.; LAWRENCE, D.S.; ZHANG, Z.Y. Small molecule approach to studying protein tyrosine phosphatase. **Methods**. v. 35, p. 9-21, 2005.

KUMAR, S.; KUMAR, V.; PRAKASH, O. Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Dillenia indica* (L.) leaves extract on alloxan induced diabetic rats. **Asian pacific of tropical medicine**, p. 347-352, 2011.

KUMAR, S.; KUMAR, V.; RANA, M.; KUMAR, D. Enzyme inhibitors from plants: An alternative approach to treat diabetes. **Pharmacognozy Communications**. v. 2, p.18-33, 2012.

KUNJATHOR, V.V.; WILSON, D.L.; LEBOEUF, Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. **J.Clin. Invest**. v.97, nº.7, p. 1767-1773, 1996.

LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; HAFFNER, S. M.; PYORALA, K.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.

LENZEM, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216-226, 2008.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n.2, 2003.

LIU, Q.; CHEN, L.; HU, L.; GUO, Y.; SHEN, X. Small molecules from natural sources, targeting signaling pathways in diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1799; p. 854-865, 2010.

- LUDVIK, B.G.P. Lipids and diabetes. **J Clin. And basic cardiol.** v. 3, nº3, p. 159-162, 2000.
- MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol.**, v. 8, p 127-147, 1983.
- MALVIYA N, JAIN S, MALVIYA S. Antidiabetic potential of medicinal plants. **Acta Pol Pharm.** v. 67, p. 113-118, 2010.
- MARLES, R. J., FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v. 2, p. 137–189, 1995.
- MAZID, M.; KHAN, T.A; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and medicine.** v. 3, p. 232-249, 2011.
- MUTHEE, J.K.; GAKUYA, D.W.; MBARIA, J.M.; KARERU, P.G.; MULEI, C.M.; NJONGE, F.K. Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitoktok district of Kenya. **J. Ethnopharmacol.** v. 135, p. 15-21, 2011.
- PRABHAKAR, P.K. & DOBLE, M. A target therapeutic approach towards Diabetes Mellitus using Medicinal Plants. **Current Diabetes Reviews.** v. 4, p. 291-308, 2008.
- PRABHAKAR, P.K. & DOBLE, M. Mechanism of action of Natural Products used in the tratament of Diabetes Mellitus. **The Chinese Journal Integrated TRadicional and Western Medicine.** v. 8. p. 563-574, 2011.
- PILKS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann Rev Physiol.**, v.54. p. 885-909.1992.
- PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTERLHUT, I.C.; VENDRAMI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decotion in streptozotocin-diabetic rats. v. 81, p. 191-197, 2002.
- RAFACHO, A.; ROMA, L. P., TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. , Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 85 , p. 536–545, 2007.
- RODRIGUEZ, P.; GONZALEZ-MUJICA, F.; BERMUDÉZ, J.; HASEGAWA, M. Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- α -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. **Fitoterapia.** v. 81, p. 1220- 1223, 2010.
- SHEPHERD, P.R.; WHITHERS, D.J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signaling. **Biochem J.** v. 333; p. 471-190, 1998.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Disponível em

www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2012. Disponível em

<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2264-diretrizes-da-sociedade-brasileira-de-diabetes-2012-2013>

STEINER, D. F.; CHAN, S. J.; WELSH, J. M.; KWOW, S.C.M. Structure and evolution of the insulin gene. **Ann. Rev. Genet.**, v. 19, p. 463-484, 1985.

SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Experimental biology and medicine**. p. 481-490, 2012.

TAHA C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **J. Membrane Biol.** v. 169, p. 1-12, 1999.

TARTAGLIA, L.A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.J.; CAMPFIELD, L.A.; CLARK, F.T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.J.; SMUTKO, J.S.; MAYS, G.G.; WOOL, E.A.; MONROE, C.A.; TEPPER, R.I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, **OB-R**. **Cell**, v.29, n°7, p.1263-71, 1995.

TOMA, T.T.; EAHMAN, S.; JAHAN, S.; HAQUE, M.M.; AGARWALA, B.; SHELLEY, M.M.R.; HOSSAIN, S.; MAHAL, M.J.; HOSSAIN, M.S.; RAHMATULLAH, M. Antihyperglycemic and antinoceptive activity of Fabaceae family plants – an evaluation of *Mimosa pigra* L. leaves. **Advances in Natural and Applied Sci**, v. 6, n., 8, p., 1552-1557, 2012.

VASCONCELOS, C.F.B. MARANHÃO, H.M.L. BATISTA, T.M. CARNEIRO, E.M. FERREIRA, F. COSTA, J. SOARES, L.A.L. SÁ, M.D.C.; SOUZA, T.P. WANDERLEY, A.G. Hypoglycemic activity and molecular mechanisms of *Cesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced. **J of Ethnopharmacol**. 2011.

WANG, C. C.; TSOU, C. L. The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule. **TIBS**. v.16, p. 279-281, 1991.

WANG, H., DUY-J, SONG, H-C. A- GLYCOSIDASE AND A-AMILASE INHIBITORY ACTIVITIES OF GUAVA LEAF. **FOOD CHEM**. V. 123, P. 6-13, 2010.

WEINERT, L. S.; SILVEIRO, S.P.; OPPERMAN, M.L.; SALAZAR, C.C.; SIMIONATO, B.M.; SIABENECHIER, A.; REICHEL, A.J. Diabetes gestacional: um algoritmo de tratamento multidisciplinar. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 55, n. 7, p. 435-445, 2011.

ZECCHIN, H.G.; CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Mecanismos moleculares de Resistência à Insulina na Síndrome Metabólica. **Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo**. v. 14, n° 4, p. 574-589, 2004

9. *ANEXOS*

9.1. ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

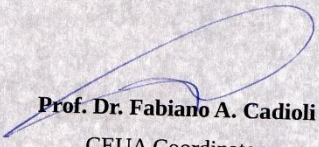
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação da ação hipoglicemiante do extrato de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina" sob responsabilidade do Pesquisador **JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO** e colaboração de Nathalia Ap. de Paula Camaforte Henriques está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01742-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of hypoglycemic effect of the extract of *Bauhinia holophylla* in diabetic mice induced by streptozotocin", process number **01742-2012**, under responsibility of **JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO** and with collaboration of Nathalia Ap. de Paula Camaforte Henriques agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária – Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução
Animal – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br

9.2. ANEXO 2

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Droga..... Via de administração.....
 Dosemg/kg; Volume da injeção;.....mL; Concentração da droga.....
 Hora da injeção.....h.....min.;Data...../...../.....
 Administrador:.....
 Investigador:.....Assinatura.....

Animal..... Sexo(); Peso.....g; Tempo de jejum.....

Sintomas	Normal	Tempo e data					
Apertacia geral	4						
Frênito vocal	0						
Irritabilidade	0						
Resposta ao toque	4						
Aperto da cauda	4						
Contorção	0						
Trem posterior	0						
Endireitamento	4						
Tônus muscular	4						
Força de agarrar	4						
Ataxia	0						
Reflexo auricular	4						
Reflexo corneal	4						
Tremores	0						
Convulsões	0						
Estimulações	4						
Straub	0						
Hipnose	0						
Anestesia	0						
Lacrimação	0						
Ptoze	0						
Micção	4						
Pilosrecção	0						
Defecação	4						
Hipotermia	0						
Respiração	4						
Cianose	0						
Morte							

Códigos: Testes com anotação normal "0", a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal "4", a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.

Observações gerais/comentários

.....

.....

.....

.....

.....

.....