

LEILA ZANATTA

**EFEITO INSULINO-MIMÉTICO DO CANFEROL-3-
NEOHESPERIDOSÍDEO NA CAPTAÇÃO DA 2-[¹⁴C (U)]-DEOXI-D-
GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS**

Florianópolis

2007

LEILA ZANATTA

EFEITO INSULINO-MIMÉTICO DO CANFEROL-3-
NEOHESPERIDOSÍDEO NA CAPTAÇÃO DA 2-[¹⁴C (U)]-DEOXI-D-
GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS

**Trabalho apresentado como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Farmácia da Universidade
Federal de Santa Catarina**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

Florianópolis

2007

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo Zanatta e Cladis Ana Zanatta que apesar da distância, sempre estiveram presentes com seu carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Agradecimento Especial

À minha orientadora Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pela amizade, dedicação, incentivo à pesquisa, e principalmente pelos inúmeros ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo Zanatta e Cladis Ana Zanatta e irmã Ana Paula Zanatta por todo carinho, ajuda e pela compreensão em todos os momentos desta caminhada.

Ao Luís U. A. Frizon, pelo carinho, paciência e apoio em todos os momentos.

Às colegas de laboratório, Ângela Rosso, Elga Alberton, Carine Royer, Poliane Folador, Danuza Menegaz, Rosângela Damazio, Luisa Cazarolli, Lisiane M. Machado e Susana Boing pela amizade, apoio e ajuda.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti pelos ensinamentos e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Farmácia pelos momentos de convivência e pelos ensinamentos compartilhados.

À professora Dra. Rozangela C. Pedrosa por compartilhar equipamentos.

Ao Departamento de Farmacologia, especialmente ao professor Dr. João Batista Calixto, por conceder o uso do espectrômetro de cintilação.

A todos os amigos aqui não mencionados e que de uma maneira ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABELAS	13
ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 DIABETES MELITO	20
1.1.1 Insulina	22
1.1.2 Vias de sinalização da insulina	24
1.1.2.1 O receptor de insulina	24
1.1.2.2 Substratos do receptor de insulina	24
1.1.2.3 PI-3K.....	25
1.1.2.4 Via CAP/Cbl	25
1.1.2.5 Outras vias de sinalização	26
1.1.3 Transportadores de glicose	26
1.1.3.1 GLUT 4.....	27
1.1.4 Regulação do metabolismo da glicose	28
1.1.4.1 Captação de glicose.....	30
1.1.4.2 Síntese de glicogênio	30
1.1.5 Hipoglicemiantes orais	31
1.1.5.1 Sulfoniluréias	31
1.1.5.2 Metaglinidas.....	31
1.1.5.3 Inibidores da α -glicosidase	32

1.1.5.4	Biguanidas	32
1.1.5.5	Glitazonas	32
1.1.5.6	Novos alvos para o tratamento do diabetes tipo 2	33
1.1.6	Terapia insulínica	33
1.2	PLANTAS MEDICINAIS	35
1.2.1	<i>Bauhinia forficata</i> Link	36
1.2.2	<i>Cyathea phalerata</i>	38
1.2.3	Flavonóides	40
<u>2</u>	<u>JUSTIFICATIVA</u>	<u>43</u>
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>45</u>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
<u>4</u>	<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>47</u>
4.1	MATERIAIS	47
4.1.1	Reagentes	47
4.1.2	Soluções.....	48
4.1.3	Equipamentos utilizados	49
4.1.4	Obtenção de compostos naturais da espécie <i>Bauhinia forficata</i> Link	49
4.1.4.1	Coleta e identificação da planta	49
4.1.4.2	Preparação do extrato bruto e frações	50
4.1.4.3	Isolamento dos flavonóides das folhas.....	50
4.1.4.4	Caracterização dos compostos	51
4.1.4.4.1	Compostos majoritários das folhas da <i>Bauhinia forficata</i>	52
4.1.5	Obtenção de compostos naturais da espécie <i>Cyathea phalerata</i>.....	53
4.1.5.1	Coleta e identificação.....	53
4.1.5.2	Preparação do extrato bruto e frações.....	53
4.1.5.3	Isolamento dos flavonóides.....	54
4.1.5.4	Caracterização dos compostos	54
4.1.5.4.1	Compostos majoritários isolados do caule fresco da espécie <i>Cyathea phalerata</i>	55
4.2	MÉTODOS	56
4.2.1	Animais	56
4.2.2	Diabetes experimental	57

4.2.3	Coleta do sangue e determinação da glicemia	58
4.2.4	Ensaio biológico <i>in vivo</i>	59
4.2.4.1	Ensaio para avaliação do efeito do canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo (canferol triglicosilado) na glicemia de ratos diabéticos	59
4.2.4.2	Ensaio para avaliação do efeito do canferol-3-neohesperidosídeo no conteúdo de glicogênio de ratos diabéticos.....	60
4.2.4.2.1	Tratamento dos animais	60
4.2.4.2.2	Extração e medida do conteúdo de glicogênio muscular.....	60
4.2.5	Ensaio biológico <i>in vitro</i>	61
4.2.5.1	Ensaio da captação de glicose no músculo sóleo	61
4.2.5.2	Ensaio para determinação da curva de dose-resposta do canferol-3-neohesperidosídeo.....	62
4.2.5.3	Ensaio para medida da captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose utilizando inibidores da PI-3K, PKC, MEK e síntese protéica	64
4.2.5.4	Ensaio para determinação do efeito sinérgico da insulina e canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose	64
4.2.5.5	Ensaio para determinação do efeito da quercetina e da insulina na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose.....	65
4.2.5.6	Ensaio para determinação do efeito do canferol (aglicona) na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose.....	66
4.2.5.7	Processamento das amostras.....	66
4.2.6	Análise morfológica	66
4.3	DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA	67
5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	68
5.1	EFEITO DO CANFEROL 3-O-β-L-RAMNOPIRANOSIL-β-D-GLICOPIRANOSÍDEO-7-O-α-L-RAMNOPIRANOSÍDEO NA GLICEMIA DE RATOS DIABÉTICOS (CANFEROL TRIGLICOSILADO)	68
5.2	CAPTAÇÃO DE ¹⁴C-DEOXI-D-GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS NORMAIS	73
5.2.1	Curva de dose-resposta do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais	74
5.3	MEDIDA DO CONTEÚDO DO GLICOGÊNIO MUSCULAR	77
5.4	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO CANFEROL-3-NEOHESPERIDOSÍDEO NA CAPTAÇÃO DE ¹⁴C-DEOXI-D-GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS NORMAIS	79

5.4.1	Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na ação da fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3K)	80
5.4.2	Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na ação da PKC.....	83
5.4.3	Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na via de MAPK.....	85
5.4.4	Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose com a síntese protéica bloqueada.....	87
5.4.5	Estudo do efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose estimulada por insulina	89
5.5	ESTUDO DO EFEITO DE OUTROS FLAVONÓIDES NA CAPTAÇÃO DE ¹⁴ C-DEOXI-D-GLICOSE NO MÚSCULO SÓLEO DE RATOS NORMAIS	91
5.5.1	Curva de dose-resposta da quercetina na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos	91
5.5.2	Efeito do canferol (aglicona) na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos	94
6	<u>CONCLUSÕES.....</u>	<u>96</u>
7	<u>PERSPECTIVAS.....</u>	<u>98</u>
8	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>100</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica da insulina: seqüência de aminoácidos.....	22
Figura 2. Secreção bifásica da insulina estimulada por glicose	23
Figura 3. Vias de sinalização da insulina	26
Figura 4. Regulação do metabolismo da glicose	29
Figura 5. Tempo de ação de insulinas exógenas	34
Figura 6. Espécie vegetal <i>Bauhinia forficata</i> Link:.....	36
Figura 7. Espécie vegetal <i>Cyathea phalerata</i>	39
Figura 8. Núcleo fundamental dos flavonóides	41
Figura 9. Estrutura química do composto canferol.....	52
Figura 10. Estrutura química dos compostos canferitrina e quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo	52
Figura 11. Estrutura química dos compostos canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo.....	53
Figura 12. Estrutura química do composto canferol-3-neohesperidosídeo	56
Figura 13. Estrutura química do composto ácido 4-O- β -D-glicopiranosil caféico	56
Figura 14. Indução do diabetes através da injeção intravenosa de aloxana na veia dorsal peniana.....	58
Figura 15. Efeito de diferentes doses do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo pela via oral na glicemia de ratos diabéticos.....	69

Figura 16. Efeito de diferentes doses do canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosideo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo pela via intraperitoneal (i.p.) na glicemia de ratos diabéticos.....	70
Figura 17. Efeito de diferentes flavonóides (100 mg/kg) administrados pela via oral na glicemia de ratos diabéticos.....	72
Figura 18. A) Músculo sóleo de ratos normais (N) e diabéticos (D) retirados da perna direita de cada animal. B) Microscopia óptica do músculo sóleo de rato normal.....	73
Figura 19. Efeito de diferentes concentrações do canferol-3-neohesperidosídeo (C-3N) e da insulina (INS) na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	75
Figura 20. Conteúdo de glicogênio no músculo sóleo de ratos controles e ratos submetidos a diferentes tratamentos.....	78
Figura 21. Efeito da insulina e do inibidor da PI-3K na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	81
Figura 22. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo e do inibidor da PI-3K na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	82
Figura 23. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo e do inibidor da PKC na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	84
Figura 24. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo e do inibidor da MEK na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	86
Figura 25. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo e da cicloheximida na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	88
Figura 26. Efeito da combinação do canferol-3-neohesperidosídeo e da insulina na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	90
Figura 27. Efeito da quercetina (aglicona) na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	92
Figura 28. Efeito da quercetina (aglicona) na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose estimulada por insulina no músculo sóleo de ratos normais.....	93
Figura 29. Efeito do canferol e de DMSO na captação de ¹⁴ C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais.....	95

Figura 30. Diagrama esquemático da captação de $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ estimulada por canferol-3-neohesperidosídeo 99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Soluções estoques utilizadas para o preparo do KRb.	62
Tabela 2. Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular.....	62

ÍNDICE DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico da <i>Bauhinia forficata</i>	50
Fluxograma 2. Representação esquemática do processo de obtenção dos compostos a partir das frações solúveis.	51
Fluxograma 3. Representação esquemática da obtenção de compostos a partir do caule da <i>Cyathea phalerata</i>	55
Fluxograma 4. Extração do glicogênio muscular	61
Fluxograma 5. Representação esquemática do ensaio de captação de [¹⁴ C]DG no músculo sóleo incubado para a curva de dose-resposta com o composto canferol-3-neohesperidosídeo.	63
Fluxograma 6. Representação esquemática do ensaio de captação de [¹⁴ C]DG no músculo sóleo incubado com o composto canferol-3-neohesperidosídeo e com inibidores da PI-3K, PKC, MEK e da síntese protéica.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etila
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína cinase ativada por 5'-AMP
APS	Substrato da proteína associada
ATP	Adenosina trifosfato
bpV(phen)	Bis-peroxivanádio 1,10-fenantroleno
CAP	Proteína associada à cbl
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
[¹⁴ C]DG	[U- ¹⁴ C]-2-deoxi-D-glicose
C-3N	Canferol 3-neohesperidosídeo
CEUA	Comitê de Ética do Uso de Animais
CI _{50%}	Concentração inibitória 50 por cento
CMV	Conselho de Medicina Veterinária
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
cpm	Contas por minuto
DM	Diabetes Melito
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPP-4	Dipeptidilpeptidase 4
eIF-4E	Fator 4E de iniciação da tradução eucariótico

4E-BP1	Proteína de ligação 1 do fator de iniciação eucariótico
EPM	Erro Padrão da Média
ERK	Cinase reguladora de sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
EtOH	Etanol
Gbq/mmol	Gigabequerel por milimol
GDP	Guanosina difosfato
GIP	Polipeptídeo insulino-trópico
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
GOD	Glicose oxidase
Grb2	Proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento
GS	Glicogênio sintase
GSK-3	Glicogênio sintase cinase-3
GTP	Guanosina trifosfato
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMIT	Transportador H ⁺ ligado ao mio-inositol
IRS	Substrato do receptor de insulina
JAK2	Janus cinase 2
JNK	Cinase c-jun NH ₂ terminal
K _m	Constante Cinética de Michaelis-Menten
KRb	Krebs-Ringer bicarbonato
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	Proteína cinase cinase ativada por mitógeno
μCi	Micro Curie

mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
NPH	Insulina com protamina neutra de Hagedorn
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDK-1	Proteína cinase 1 dependente de PI-3K
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PI-3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKA	Proteína Cinase A
PKB	Proteína Cinase B
PKC	Proteína Cinase C
PLC	Fosfolipase C
p38 MAPK	p38 Proteína cinase ativada por mitógeno
POD	Peroxidase
PP1	Proteína fosfatase 1
PPAR γ	Receptor nuclear proliferador ativado dos peroxisomas γ
p70rsk	p70 ribossomal S6 cinase
SGLT1	Transportador de glicose dependente de sódio 1
SH2	Homólogo 2 Src
SHP2	Proteína tirosina fosfatase homóloga de Src 2
SNAP25	Proteína de 25 kD associada à sinaptossoma
SNARE	Proteína do receptor ligada a NSF solúvel
T CD4+	Linfócito tipo T CD4+
T CD8+	Linfócito tipo T CD8+
T/M	Relação tecido/ meio
VAMP2	Proteína 2 da vesícula associada à membrana

V_{max}

Velocidade máxima

RESUMO

O diabetes melito é caracterizado como um grupo de desordens com diferentes etiologias, que afeta o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. É causado pela deficiência inerente ou adquirida da produção de insulina ou pela sua inefetividade. Muitas espécies de plantas são conhecidas na medicina popular pelas propriedades hipoglicemiantes e a utilização destas plantas é uma alternativa de tratamento para os diabéticos, principalmente aqueles que não têm acesso aos medicamentos. Flavonóides são compostos fenólicos, derivados de plantas, que apresentam diversas propriedades e cujo potencial terapêutico é cada vez mais investigado. Recentemente foram isolados alguns destes compostos das folhas da *Bauhinia forficata*, entre eles o majoritário, canferitrina. Este demonstrou efeito hipoglicemiante em animais diabéticos, além de estimular a captação de glicose no músculo sóleo de ratos. Do caule da espécie *Cyathea phalerata* também foram isolados flavonóides, sendo o canferol-3-neohesperidosídeo, o predominante e cuja ação hipoglicemiante foi ainda melhor do que da canferitrina. O presente trabalho teve como objetivos estudar o mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo, obtido da *Cyathea phalerata*, na captação de [¹⁴C]DG e no conteúdo de glicogênio muscular e comparar com o efeito estimulatório da insulina. Além disso, estudar o efeito da quercetina e do canferol (aglicona) na captação de [¹⁴C]DG e o efeito hipoglicemiante de outro flavonóide isolado da *Bauhinia forficata*, o canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo, em ratos diabéticos. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos entre 50-55 dias de idade. O diabetes foi induzido com 50 mg/kg de aloxana pela via intravenosa. Nos experimentos onde foram estudados os níveis glicêmicos, as dosagens foram realizadas nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após a administração do composto pelas vias oral e intraperitoneal. Nos ensaios para determinação do conteúdo de glicogênio os tecidos foram retirados dos animais após 24 h da administração do canferol-3-neohesperidosídeo. A captação de [¹⁴C]DG foi estudada após a incubação do músculo sóleo com canferol-3-neohesperidosídeo, insulina, quercetina ou canferol, na presença ou não de diferentes inibidores e do radioisótopo no período de 1 h. A captação de [¹⁴C]DG foi estimulada significativamente pelo canferol-3-neohesperidosídeo. Este aumento no transporte de glicose foi semelhante ao apresentado pela insulina, ocorrendo via PI-3K e PKC e independentemente da síntese ativa de proteínas. O conteúdo de glicogênio muscular aumentou aproximadamente 4 vezes nos animais tratados com canferol-3-neohesperidosídeo. A quercetina estimulou a captação de [¹⁴C]DG no músculo sóleo de ratos normais, mas não potenciou o efeito estimulatório da insulina e o canferol não demonstrou efeito na captação de [¹⁴C]DG. O canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo não apresentou ação hipoglicemiante significativa em nenhuma das doses e tempos estudados. Destes resultados podemos concluir que o canferol-3-neohesperidosídeo foi tão eficaz e potente quanto a insulina no estímulo da captação de glicose no músculo sóleo. Aparentemente, pelas mesmas vias de sinalização da insulina que levam à ativação da translocação de GLUTs sem interferir na transcrição gênica e síntese protéica neste período agudo de ação. Além disso, foi hábil em aumentar o conteúdo de glicogênio muscular após um período prolongado de tratamento.

Palavras-Chave: Canferol-3-neohesperidosídeo, Flavonóides, Captação de Glicose, Glicogênio, Músculo Sóleo

ABSTRACT

Diabetes mellitus is characterised as a group of disorders with different aetiologies that affect the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins. It is caused by an inherent or acquired deficiency in the production of insulin or by its ineffectiveness. Many plant species are known in popular medicine for their hypoglycaemic proprieties and the use of these plants represents an alternative treatment for diabetics, especially those who do not have access to medicines. Flavonoids are phenolic compounds derived from plants, which present diverse proprieties and whose therapeutic potential is being increasingly investigated. Some of these compounds were recently isolated from the leaves of *Bauhinia forficata*, including the predominant compound, kaempferitrin. This displayed a hypoglycaemic effect in diabetic animals, besides stimulating glucose uptake in the soleus muscle of rats. Also isolated from the stalk of the species *Cyathea phalerata* were flavonoids, including kaempferol-3-neohesperidoside, the predominant compound whose hypoglycaemic action was even greater than that of kaempferitrin. The objectives of the present investigation were to study the mechanism of action of kaempferol-3-neohesperidoside, obtained from *Cyathea phalerata*, on the uptake of [¹⁴C]DG, as well as on the muscle glycogen content, and to compare this with the stimulatory effect of insulin. In addition, the effect was studied of quercetin and of kaempferol (aglicone) on the uptake of [¹⁴C]DG, as well as the hypoglycaemic effect of another flavonoid isolated from *Bauhinia forficata*, kaempferol-3-O-β-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranosyde-7-O-α-L-rhamnopyranosyde in diabetic rats. Male Wistar rats aged 50-55 days were used. Diabetes was induced with 50 mg/kg of alloxan given by intravenous route. In the experiments to study levels of glycemia, samples were taken at 0, 1, 2 and 3 h after administration of the compound by oral and intraperitoneal routes. In the assays for the determination of the glycogen content tissues were removed from animals 24 h after the administration of kaempferol-3-neohesperidoside. The uptake of [¹⁴C]DG was studied after incubation of the soleus muscle for 1 h with kaempferol-3-neohesperidoside, insulin, quercetin or kaempferol, in the presence or not of different inhibitors and of the radioisotope. The uptake of [¹⁴C]DG was significantly stimulated by kaempferol-3-neohesperidoside. This increase in glucose transport was similar to that presented by insulin, occurring via PI-3K and PKC and independent of active protein synthesis. The muscle glycogen content increased approximately 4-fold in the animals treated with kaempferol-3-neohesperidoside. Quercetin stimulated the uptake of [¹⁴C]DG in the soleus muscle of normal rats, but did not potentiate the stimulatory effect of insulin, and kaempferol did not exhibit any effect on the uptake of [¹⁴C]DG. Kaempferol-3-O-β-L-rhamnopyranosyl-β-D-glucopyranosyde-7-O-α-L-rhamnopyranosyde did not present a significant hypoglycaemic action at any of the doses and times studied. From these results we can conclude that kaempferol-3-neohesperidoside was as efficacious and potent as insulin in stimulating glucose uptake in the soleus muscle. It appears to act through the same intracellular signalling pathways as insulin, causing the translocation of GLUTs without interfering in gene transcription and protein synthesis during its acute phase of action. In addition, it exhibited the capacity to increase the muscle glycogen content after a prolonged period of treatment.

Key words: Kaempferol-3-neohesperidoside, Flavonoids, Glucose Uptake, Glycogen, Soleus Muscle

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELITO

Diabetes Melito (DM) é o nome de um grupo de desordens com diferentes etiologias. Esta é caracterizada pelo distúrbio no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios causado pela completa ou relativa insuficiência da secreção e/ou ação da insulina (O'BRIEN; GRANNER, 1996; ALARCON-AGUILAR et al., 2000; ISLAS-ANDRADE et al., 2000). Tal deficiência resulta em aumento nas concentrações de glicose no sangue, o qual pode causar muitos danos nos sistemas biológicos, em particular nos vasos sanguíneos e nervos (WHO, 2006a).

Os sintomas decorrentes da hiperglicemia acentuada incluem perda de peso, polidipsia, poliúria, polifagia e infecções. Mesmo em indivíduos assintomáticos pode haver hiperglicemia discreta, porém em grau suficiente para causar alterações morfológicas ou funcionais por um longo período de tempo antes do diagnóstico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

Clinicamente existem duas formas básicas da doença: Tipo 1 ou Insulino-Dependente e Tipo 2 ou Não-Insulino-Dependente. Também existe um terceiro tipo, o DM Gestacional, que se desenvolve, em alguns casos, durante a gravidez e normalmente desaparece após o parto (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; WHO, 2006b). O Tipo 1 é causado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas pelas células T CD4+, T CD8+ e por macrófagos infiltrados nas ilhotas. Representa aproximadamente 10% de todos os casos de diabetes (GILLESPIE, 2006). Genética e fatores ambientais atuam juntos para precipitar a doença que se caracteriza pela ausência de secreção endógena de insulina podendo levar à redução da captação periférica da glicose e incapacidade de suprimir a produção hepática (gliconeogênese e glicogenólise) causando a hiperglicemia (BEARDSALL et al., 2003; VATS et al., 2005). A forma rapidamente progressiva é encontrada comumente

em crianças e adolescentes, porém pode ocorrer em adultos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2006a).

O Tipo 2 é a forma mais comum da doença representando aproximadamente 90% das pessoas com diabetes. É uma desordem metabólica que resulta da interação complexa de múltiplos fatores e se caracteriza por dois defeitos principais: diminuição na secreção da insulina pelo pâncreas, resistência à insulina em vários tecidos (músculo, fígado e tecido adiposo) ou ambos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; CHENG; FANTUS, 2005; MALECKI; KUPLA, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2006a). A resistência à insulina está geralmente presente antes do início do diabetes, é determinada por um número de fatores, incluindo genético, idade, obesidade e mais tarde, durante a doença, hiperglicemia. Outros achados podem incluir fibrinólise alterada, aumento da agregação plaquetária, inflamação vascular, disfunção endotelial e aterosclerose prematura. Excesso de adiposidade visceral, dislipidemia e hipertensão freqüentemente acompanham a resistência à insulina. Defeitos na função do receptor de insulina, nas vias de transdução de sinal, no transporte, fosforilação e oxidação de glicose e síntese de glicogênio contribuem para a resistência do tecido muscular à insulina (DEFRONZO, 1999). O aumento na lipólise pelas células adiposas que são resistentes à insulina e os níveis aumentados de ácidos graxos livres circulantes também contribuem para patogênese do diabetes danificando a função das células β , modificando a captação da glicose nos músculos esqueléticos e promovendo a liberação de glicose do fígado (CHENG; FANTUS, 2005). A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais, como infecções graves. O diagnóstico é feito geralmente após os 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; KOSKI, 2004). Quando pobremente controlada ou não diagnosticada a doença pode estar associada a complicações tardias como aterosclerose acelerada, retinopatia com potencial perda da visão, catarata, nefropatia que pode levar à insuficiência renal, neuropatia periférica e doença cardíaca, além da diminuição da expectativa de vida (MALECKI; KUPLA, 2005; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006).

O Diabetes Melito é um dos mais importantes problemas de saúde mundial, apresentando altos índices de prevalência e mortalidade (ALARCON-AGUILAR et al., 2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2006; WHO, 2006c). Estudos demonstram que 2,9 milhões de pessoas morreram em 2000 em consequência do diabetes e que

aproximadamente 171 milhões de adultos maiores de 20 anos têm diabetes melito em todo o mundo sendo que este número pode chegar a 334 milhões até 2030 (WILD et al., 2004; LEDUC et al., 2006; ROGLIC et al., 2005; WHO, 2006c). Este aumento se deve ao crescimento da população com mais de 65 anos de idade, hábitos de vida sedentários e obesidade. No Brasil a prevalência de pacientes diabéticos em 2000 era de 4,6 milhões e se estima que até 2030 sejam 11,30 milhões de diabéticos (WILD et al., 2004; WHO, 2006d). O diabetes apresenta um custo elevado ao indivíduo e à sociedade. Estes custos estão relacionados não somente aos gastos com saúde, mas também ao custo indireto causado pela perda da produtividade devido à inabilidade e à mortalidade prematura. Em termos econômicos, nos Estados Unidos, as estimativas de custo total em 2002 foi de US\$ 133 bilhões, no Canadá o custo total se aproxima de US\$ 5 bilhões e na América Latina e no Caribe o custo do diabetes foi estimado em US\$ 65 bilhões em 2000 (BARCELÓ et al., 2003).

1.1.1 *Insulina*

A insulina é um hormônio polipeptídico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas. É composta por 51 aminoácidos arranjados em duas cadeias polipeptídicas, designadas A e B, as quais estão ligadas por pontes dissulfeto (Figura 1). A síntese ocorre a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina no retículo endoplasmático onde é clivada à pró-insulina. Esta é convertida à insulina e armazenada em vesículas no complexo de golgi (NORMAN; LITWACK, 1997).

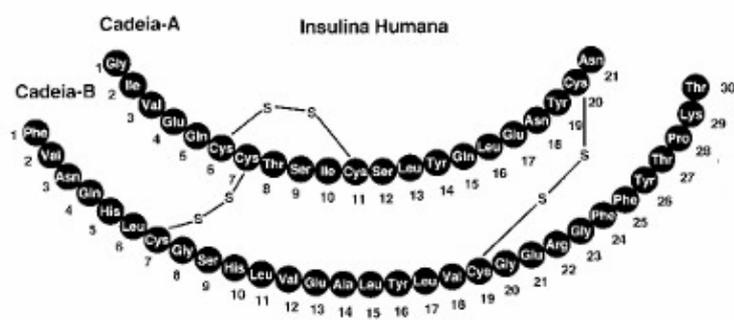


Figura 1. Estrutura básica da insulina: seqüência de aminoácidos

A glicose é o estímulo primário para a secreção de insulina pelas células β do pâncreas, embora haja outros mecanismos como os aminoácidos leucina e arginina, hormônios como glucagon, colecistocinina, peptídeo inibitório gástrico, peptídeo intestinal vasoativo e peptídeo semelhante ao glucagon (NORMAN; LITWACK, 1997; BEARDSALL et al., 2003).

Quando estimulada por glicose a secreção de insulina é bifásica, com uma fase inicial rápida com a liberação dos estoques de insulina, seguida de uma fase com maior duração mantida pela biossíntese do hormônio (Figura 2). A meia-vida da insulina circulante é de 3 a 5 minutos e o metabolismo ocorre principalmente no fígado e rins por ação das insulinases (NORMAN; LITWACK, 1997; BEARDSALL et al., 2003; HENQUIN et al., 2006).

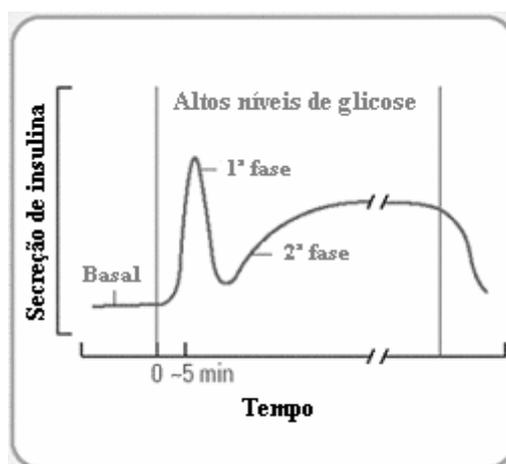


Figura 2. Secreção bifásica da insulina estimulada por glicose (adaptado de <http://www.servier.com/imgs/Pro/diabeto/diabetographia/ud/1/1.gif>)

A secreção de insulina ocorre, principalmente, em função da hiperglicemia, que resulta em níveis intracelulares aumentados de ATP levando ao fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP. A diminuição da entrada de potássio causa despolarização da membrana das células β pancreáticas e abertura dos canais de cálcio com conseqüente aumento do cálcio intracelular que por sua vez, desencadeia a secreção do hormônio (NORMAN; LITWACK, 1997; MCGARRY; DOBBINS, 1999).

1.1.2 Vias de sinalização da insulina

1.1.2.1 O receptor de insulina

A insulina exerce os efeitos biológicos através da fosforilação de proteínas, resultando no aumento do transporte de glicose, mitogênese e regulação de vias enzimáticas (NYSTROM; QUON, 1999). Para exercer os efeitos metabólicos a insulina se liga ao receptor presente na superfície das células dos tecidos alvos. Este receptor é uma proteína heterotetramérica que possui uma atividade tirosina cinase intrínseca e é composto de duas subunidades α extracelulares, que contêm o sítio de ligação para insulina, ligadas por pontes dissulfeto a duas subunidades β transmembrana, onde se encontram os domínios de tirosina cinase. A ligação da insulina à subunidade α induz uma mudança conformacional e conseqüente autofosforilação da subunidade β do receptor, aumentando ainda mais a atividade cinase do receptor (NORMAN; LITWACK, 1997; WATSON; PESSIN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002; GUAL et al., 2004).

1.1.2.2 Substratos do receptor de insulina

O receptor de insulina ativado é capaz de fosforilar vários substratos protéicos como a família de substratos para o receptor de insulina (IRS 1-4), Shc, Gab-1, p60^{doc}, Cbl, JAK2 e APS. Após a fosforilação de IRS em resíduos de tirosina, estes substratos criam sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2. Muitas destas proteínas são moléculas adaptadoras tais como a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3K), ou enzimas como SHP2 e a tirosina cinase citosólica Fyn (SALTIEL; KAHN, 2001; WATSON; PESSIN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002). IRS-1 e IRS-2 são importantes nas ações da insulina; IRS-1 está envolvida na transdução de sinal no músculo, IRS-2 no desenvolvimento das células β e ambas são importantes na regulação do metabolismo no fígado (KROOK et al., 2004). A função de IRS-3 e -4 ainda não está clara, mas parece que eles atuam como reguladores de IRS-1 e -2 (SALTIEL; KAHN, 2001).

1.1.2.3 PI-3K

PI-3K é uma enzima importante na regulação da mitogênese e nas ações metabólicas da insulina. Consiste de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). Essa enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. A fosforilação na posição 3 recruta e ativa proteínas como proteína cinase 1 dependente de PI-3K (PDK-1) e proteína cinase B (PKB) (também conhecida como akt) (SALTIEL; KAHN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002; KHAN; PESSIN, 2002; KROOK et al., 2004). Em seguida, PDK-1 fosforila e ativa PKB e isoformas de proteína cinase C (PKC) atípica (ζ , λ). Um dos principais efeitos da ativação de PKB é o aumento da captação de glicose através da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT 4) e a síntese de glicogênio através da inativação da glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) (ŽDYCHOVÁ; KOMERS, 2005). PKB também atua na síntese e bloqueio da degradação de proteínas através da fosforilação do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) que por sua vez ativa p70 ribossomal S6 cinase (p70rsk) assim como eIF-4E e 4E-BP1 (SALTIEL; KAHN, 2001; ŽDYCHOVÁ; KOMERS, 2005). Da mesma forma PKC ζ e PKC λ aumentam a captação de glicose através da ativação e translocação do GLUT 4, estas isoformas também estão envolvidas na absorção de glicose, síntese de glicogênio e secreção de insulina (KHAN; PESSIN; 2002; LIU, X. et al., 2006). A ativação de PI-3K é necessária, mas não suficiente para as ações metabólicas da insulina, sugerindo que outras cascatas devem estar envolvidas na regulação do transporte da glicose (Figura 3).

1.1.2.4 Via CAP/Cbl

Além da via da PI-3K, CAP/Cbl também está envolvida no transporte de glicose. Essa via envolve a fosforilação de Cbl que se apresenta associado à proteína adaptadora CAP. Após a fosforilação, o complexo Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com CrkII que também está associada com C3G. C3G é uma proteína que catalisa a troca do nucleotídeo GDP por GTP da proteína TC10 ativando-a. TC10 ativada envia um sinal para translocação do GLUT 4 e conseqüente aumento na captação de glicose (SALTIEL; KAHN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002; KHAN; PESSIN, 2002).

1.1.2.5 Outras vias de sinalização

Insulina também estimula a via da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Esta via envolve a fosforilação de IRS e/ou Shc a qual interage com Grb2 recrutando SOS para a membrana plasmática e ativando Ras. Uma vez ativada, Ras recruta Raf para membrana plasmática através da interação direta com a região efetora. A ativação de Raf resulta na ativação da proteína cinase cinase ativada por mitógeno (MEK) via fosforilação. MEK por sua vez ativa MAPK que leva à proliferação e diferenciação celulares (TAHA; KLIP, 1999; SALTIEL; KAHN, 2001; WATSON; PESSIN, 2001; CARVALHEIRA et al., 2002).

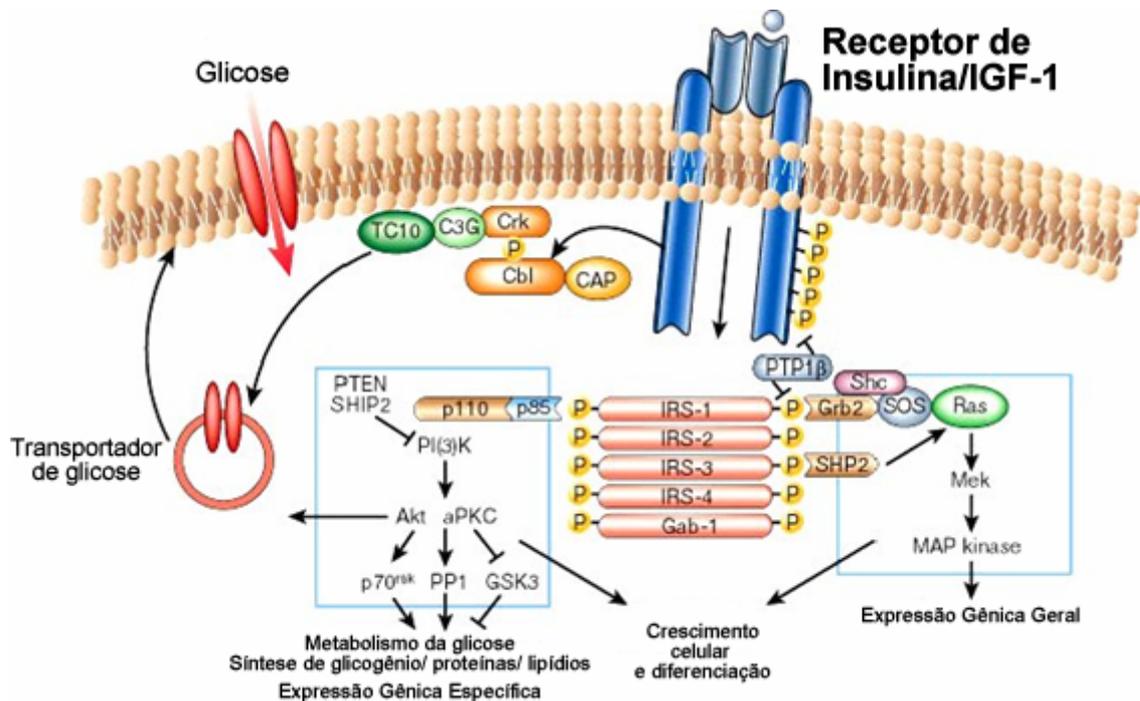


Figura 3. Vias de sinalização da insulina (adaptado de SALTIEL; KAHN, 2001)

1.1.3 Transportadores de glicose

O transporte da glicose através da membrana ocorre por difusão facilitada, um processo que independe de energia e que utiliza carregadores protéicos (KLIP et al., 1994;

RICHTER, 1998). Os carreadores de glicose podem ser divididos em dois grupos: GLUT (transporte de glicose facilitada) e SGLT1 (transporte de glicose dependente de sódio). SGLT1 localizam-se no intestino delgado e subtipos de GLUTs são descritos em diferentes tecidos de mamíferos (PERREIRA; LANCHÁ JR., 2004). A família de transportadores de glicose facilitada (GLUT) é composta de 14 membros que são divididos em 3 classes de acordo com as características estruturais (SCHEEPERS et al., 2004; MACHADO et al., 2006). A classe I é a melhor caracterizada e é composta pelos GLUTs 1-4 e o recentemente descoberto GLUT 14. O GLUT 1 é expresso principalmente nos eritrócitos humanos e células epiteliais das veias do cérebro. O GLUT 2 é o transportador de baixa afinidade presente no fígado, intestino, rins e células β pancreáticas. O GLUT 3 tem alta afinidade por glicose e está presente em tecidos que demandam grande quantidade de glicose como o cérebro, tecido muscular e o coração. O GLUT 4 é a isoforma responsável pela diminuição dos níveis de glicose sanguínea pós-prandial, está presente no músculo esquelético, nos adipócitos e no coração (WATSON; PESSIN, 2001; WOOD; TRAYHURN, 2003; PERREIRA; LANCHÁ JR., 2004; SCHEEPERS et al., 2004). Na classe II estão incluídos os GLUT 5, GLUT 7, GLUT 9 e GLUT 11. GLUT 5 é o transportador da frutose presente no intestino, mas também é encontrado nos testículos e rins. GLUT 7 é encontrado no intestino, colon, testículos e próstata e o GLUT 9 é altamente expresso nos rins e fígado. O GLUT 11 apresenta duas formas (uma curta e outra longa) que são expressas em diferentes tecidos e apresenta baixa afinidade por glicose além de transportar frutose. A classe III é composta pelas isoformas GLUT 6, GLUT 8, GLUT 10, GLUT 12 e HMIT. O GLUT 6 apresenta baixa afinidade por glicose e é expresso no cérebro, leucócitos e vesícula biliar enquanto que o GLUT 8 apresenta alta afinidade por glicose e é expresso principalmente nos testículos. O GLUT 10 é predominantemente expresso no fígado e pâncreas e está associado com o diabetes do tipo 2. GLUT 12 é expresso predominantemente no coração e próstata e o HMIT no cérebro (WOOD; TRAYHURN, 2003; SHEEPERS et al., 2004).

1.1.3.1 GLUT 4

O GLUT 4 é o principal transportador de glicose estimulado por insulina e se encontra predominantemente no tecido adiposo e músculo esquelético. Sua função está relacionada ao aumento da captação de glicose por esses tecidos. No estado basal, o GLUT 4

se localiza principalmente no compartimento intracelular. A insulina causa a translocação deste transportador dos estoques intracelulares para a membrana plasmática onde ele catalisa o transporte da glicose para dentro da célula. Existem pelo menos duas vias identificadas que estão envolvidas nessa translocação: a via da PI-3K e da CAP–CrkII–C3G–TC10 (WATSON; PESSIN, 2001; HE et al., 2006). No processo de translocação e fusão com a membrana plasmática, dois grupos de proteínas sinalizadoras estão envolvidas, v-SNAREs e t-SNAREs. Algumas dessas proteínas (VAMP2, syntaxin4, SNAP23 e munc18) regulam a fusão das vesículas com a membrana plasmática. A insulina recruta as vesículas de GLUT 4 através da fosforilação de VAMP2. Essa proteína interage com SNAP23 e syntaxin4 formando um complexo ternário. Concomitantemente à formação desse complexo ocorre a dissociação da proteína synip da syntaxin4 e a mudança conformacional de munc18c expondo o domínio de ligação do complexo ternário e promovendo a fusão das vesículas com a membrana (WATSON; PESSIN, 2001; PEREIRA; LANCHETA JR., 2004; HE et al., 2006; LIU, L. et al., 2006).

1.1.4 Regulação do metabolismo da glicose

Existe um equilíbrio dinâmico que mantém um constante e controlado fornecimento de glicose aos tecidos. A glicose é a principal fonte de energia para o organismo humano, sendo o combustível primário utilizado por alguns tecidos como o cérebro e pelos eritrócitos (BEARDSALL et al., 2003).

A insulina é o hormônio essencial que regula o metabolismo, o crescimento e a diferenciação celular atuando em diversos tecidos, principalmente fígado, músculo e tecido adiposo (NYSTROM; QUON, 1999; ZIERATH; KAWANO, 2003). Este é o mais potente hormônio anabólico conhecido, que promove a síntese e o armazenamento de carboidratos, lipídios e proteínas (SALTIEL; KAHN, 2001).

A homeostasia da glicose é mantida por uma rede hormonal em que a insulina e o glucagon são os principais agentes. A síntese e a secreção da insulina são estimuladas por níveis aumentados da glicose, particularmente após a alimentação (DESVERGNE et al., 2006). A liberação da insulina permite a remoção rápida da glicose circulante estimulando a entrada da glicose nos tecidos periféricos, principalmente no músculo e tecido adiposo. Em

paralelo, a insulina aumenta o armazenamento da energia induzindo a síntese do glicogênio no fígado e no músculo, e síntese dos ácidos graxos no fígado e no tecido adiposo (Figura 4) (NORMAN; LITWACK, 1997; KHAN; PESSIN, 2002; BEARDSALL et al., 2003; DESVERGNE et al., 2006).

Quando os níveis da insulina forem baixos, entre refeições ou em jejum, o glucagon aumenta a produção e a liberação hepática de glicose aumentando a glicogenólise e estimulando a gliconeogênese. O pâncreas é o órgão principal desta regulação, produzindo insulina e glucagon. A função do fígado é fornecer glicose quando os nutrientes forem escassos e armazenar este açúcar na forma de glicogênio quando o alimento for abundante. Uma vez que os estoques de glicogênio do fígado estão repletos, o tecido adiposo converte glicose em triacilglicerol que é estocado como gordura. Os músculos consomem mais do que estocam energia, embora acumulem eficientemente glicogênio para uso próprio. O cérebro pode usar apenas glicose e/ou a cetona como fonte de energia. Sendo assim, o fato da glicose representar a única fonte da energia para algumas células impõe um controle justo sobre a glicemia (BEARDSALL et al., 2003; DESVERGNE et al., 2006).

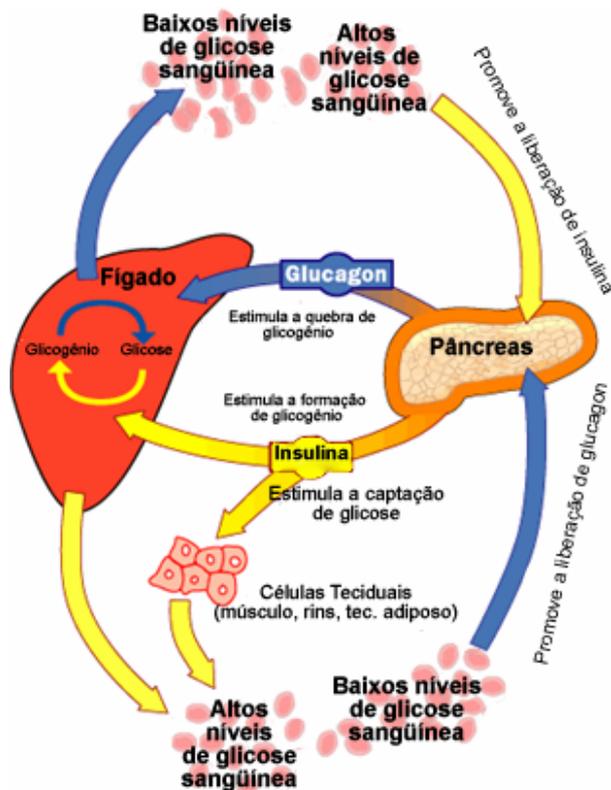


Figura 4. Regulação do metabolismo da glicose (adaptado de <http://health.howstuffworks.com/diabetes1.htm>)

1.1.4.1 Captação de glicose

O transporte de glicose estimulado por insulina ocorre basicamente através da translocação dos transportadores, principalmente do GLUT 4, de estoques intracelulares para a membrana plasmática (KHAN; PESSIN, 2002). A atividade tirosina cinase do receptor de insulina é essencial para o transporte de glicose. No entanto, a enzima chave deste estímulo por insulina é a PI-3K. Os elementos ativados após a PI-3K que regulam a translocação do GLUT 4 ainda estão sendo desvendados, mas é sugerido o envolvimento de PKB e isoformas atípicas de PKC. É improvável que a via de MAPK esteja envolvida na rápida translocação do GLUT 4 ou estimulação do transporte de glicose, no entanto, ela participa do aumento da síntese de GLUT 3 em células musculares estimulada por insulina (TAHA; KLIP, 1999).

No músculo esquelético, o transporte de glicose pode ser ativado por, pelo menos, duas vias distintas: uma estimulada por insulina ou agentes insulino-miméticos e a outra ativada pela contração muscular e hipóxia. Nesta via de regulação do transporte de glicose não-insulino dependente um dos reguladores é a proteína cinase ativada por 5'-AMP (AMPK) e o outro é o íon cálcio (KROOK et al., 2004; WIJESEKARA et al., 2006).

1.1.4.2 Síntese de glicogênio

O músculo esquelético é o principal local de captação de glicose estimulada por insulina e muito da glicose que entra nas fibras musculares em resposta à insulina é depositada como glicogênio (TAHA; KLIP, 1999). A insulina ativa a glicogênio sintase (GS) promovendo a desfosforilação através da inibição de cinases como proteína cinase A (PKA) ou glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) e ativação da proteína fosfatase 1 (PP1). Após ativação pela PI-3K, a PKB fosforila e inativa a GSK-3 o que diminui a taxa de fosforilação da GS aumentando a atividade. A insulina também ativa a PP1 por um processo dependente da PI-3K que desfosforila a GS diretamente (SALTIEL; KAHN, 2001).

1.1.5 Hipoglicemiantes orais

1.1.5.1 Sulfoniluréias

São classificadas em primeira e segunda geração. As gerações variam em potência, farmacocinética e segurança (KOSKI, 2004). Estimulam a secreção de insulina se ligando a um receptor específico na célula β pancreática que determina o fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP. Este fechamento resulta em despolarização da célula, liberação da insulina pré-formada nos grânulos adjacentes (primeira fase de liberação de insulina) e aumento da translocação dos grânulos de dentro da célula para a periferia (segunda fase da liberação de insulina). Este aumento se mantém (durante o tempo de ação do fármaco) desde que as células estejam funcionantes. As sulfoniluréias podem provocar hipoglicemia, pois a ação inicia mesmo com valores de glicemia abaixo do limiar de estimulação da insulina por glicose (90 mg/dL ou 5 mmol/L) e se mantém ao longo da duração da semi-vida (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; CHENG; FANTUS, 2005; GALLEGO, 2005).

1.1.5.2 Metaglinidas

Se ligam a receptores na célula β pancreáticas, diferente dos receptores das sulfoniluréias. A ação é mais rápida e mais curta quando em comparação a este grupo de agentes antidiabéticos. Não se sabe se o efeito hipoglicemiante é aditivo ao das sulfoniluréias, mas o efeito sobre a redução da glicose plasmática e da hemoglobina glicada é semelhante aos medicamentos de ação intermediária desta classe (glibenclamida e gliclazida). Têm efeito aditivo à metformina. As hipoglicemias são menos freqüentes com estes fármacos do que com as sulfoniluréias se tomadas antes da ingestão alimentar (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; GALLEGO, 2005).

1.1.5.3 Inibidores da α -glicosidase

Estes fármacos não apresentam um alvo específico na fisiopatologia do diabetes. Esta classe inibe competitivamente as α -glicosidases intestinais (maltase, isomaltase, sacarase, glicoamilase) retardando a absorção de carboidratos e, conseqüentemente, a entrada da glicose na circulação. Os efeitos colaterais principais de inibidores das α -glicosidases são gastrointestinais; especificamente, desconforto abdominal, diarréia e flatulência ocorrem em aproximadamente 20% dos pacientes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; CHENG; FANTUS, 2005).

1.1.5.4 Biguanidas

Há 30 anos várias biguanidas foram usadas em diversos países para o tratamento do diabetes. Todas com exceção da metformina foram removidas do mercado internacional na década de 70 devido ao risco associado à elevação de acidose láctica, restando atualmente apenas a metformina.

A metformina é um composto que aumenta a sensibilidade da insulina nos tecidos periféricos, principalmente no fígado. A redução da glicemia provocada por este fármaco se deve especialmente à diminuição da produção hepática de glicose (inibindo a gliconeogênese) e à redução dos níveis de triglicérides (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; CHENG; FANTUS, 2005; GALLEGO, 2005). A metformina atua ativando a AMPK muscular e hepática resultando no bloqueio da síntese de ácidos graxos e promovendo a oxidação. Além disso, diminui a expressão gênica de enzimas lipogênicas que contribuem para diminuir a síntese de triglicérides (CHENG; FANTUS, 2005).

1.1.5.5 Glitazonas

Melhoram a tolerância à glicose aumentando a sensibilidade à insulina e restaurando a função das células β pancreáticas (KIM; AHN, 2006). Aumentam o consumo de glicose pelos tecidos periféricos (muscular e adiposo), diminuem a produção hepática de glicose e aumentam a síntese de glicogênio. As tiazolidinodionas se ligam a um receptor nuclear

proliferador ativado dos peroxisomas γ (PPAR γ), levando ao aumento da expressão dos substratos do receptor de insulina (IRS-1, -2), da subunidade p85 da PI-3K e de Cbl aumentando a captação de glicose no músculo. Ainda favorecem a transformação de pré-adipócitos em adipócitos pequenos, mais sensíveis à insulina, com apoptose dos grandes e menos sensíveis, reduzindo os níveis de ácidos graxos livres e triglicérides, mas, contudo, promovendo ganho de peso (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2003; KIM; AHN, 2004; CHENG; FANTUS, 2005; GALLEGO, 2005). Além destes efeitos nos fígado e tecidos periféricos as glitazonas exercem profundos efeitos nas células β pancreáticas; melhorando a capacidade secretória, aumentando a massa destas células e protegendo essas células do estresse oxidativo (CAMPBELL; MARIZ, 2007).

1.1.5.6 Novos alvos para o tratamento do diabetes tipo 2

O emergente conhecimento dos mecanismos que envolvem a patogenia do diabetes fornece novos alvos moleculares para o desenvolvimento de fármacos. Dentre esses possíveis novos fármacos para o tratamento do diabetes se destacam os que atuam reduzindo a produção excessiva de glicose hepática como os antagonistas do receptor do glucagon, inibidores da glicogênio fosforilase, glicose-6-fosfatase e frutose-1,6-bifosfatase. Os que atuam aumentando os efeitos da insulina como moléculas ativadoras do receptor de insulina, inibidores da proteína tirosina fosfatase-1B e da GSK-3 (MOLLER, 2001; VATS et al., 2005). E as incretinas como GIP (polipeptídeo insulínico) e GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon 1) que são secretadas em resposta a ingestão de alimentos, potencializando a secreção de insulina estimulada pela glicose e aumentando a massa de células β pancreáticas. O uso de análogos destes hormônios tem sido estudado para o tratamento do diabetes assim como o de inibidores da DPP-4 (dipeptidilpeptidase 4) que aumentam a vida de GLP-1 (HARDIKAR, 2004; MCINTOSH et al., 2006; HANSOTIA; DRUCKER, 2004)

1.1.6 Terapia insulínica

A administração de insulina é fundamental para o tratamento do diabetes melito tipo 1. Pacientes com diabetes do tipo 2 são inicialmente tratados com agentes hipoglicemiantes

orais, no entanto, com a evolução da doença, muitos destes pacientes também necessitam da terapia insulínica para manutenção do controle glicêmico (SIMÓ; HERNÁNDEZ, 2002; BETHEL; FEINGLOS, 2005; ELDOR et al., 2005).

Como a insulina é degradada no trato gastrointestinal é preciso administrá-la pela via subcutânea e em alguns casos de severa descompensação metabólica ela pode ser administrada pela via intravenosa ou muscular (SIMÓ; HERNÁNDEZ, 2002). Os riscos e os efeitos adversos da terapia insulínica são a hipoglicemia e o ganho de peso, raramente, alergia e infecção ocorrem (ELDOR et al., 2005; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2005).

Diversas preparações de insulina são utilizadas para tratar do diabetes. Estas incluem as insulinas de ação rápida (aspart, lispro) e de curta duração (regular) que são utilizadas pouco antes das refeições e apresentam início de ação rápido, no entanto, de menor duração. Insulinas com uma duração de ação intermediária (insulina NPH e lenta) apresentam um período de ação mais longo e as insulinas de ação prolongada (insulina ultralenta, glargina e detemir) têm início de ação muito lento e seus níveis mantêm-se durante todo dia (Figura 5) (DAUGHERTY, 2004; HERMANSEN et al., 2004; BETHEL; FEINGLOS, 2005; BRUNTON et al., 2005).

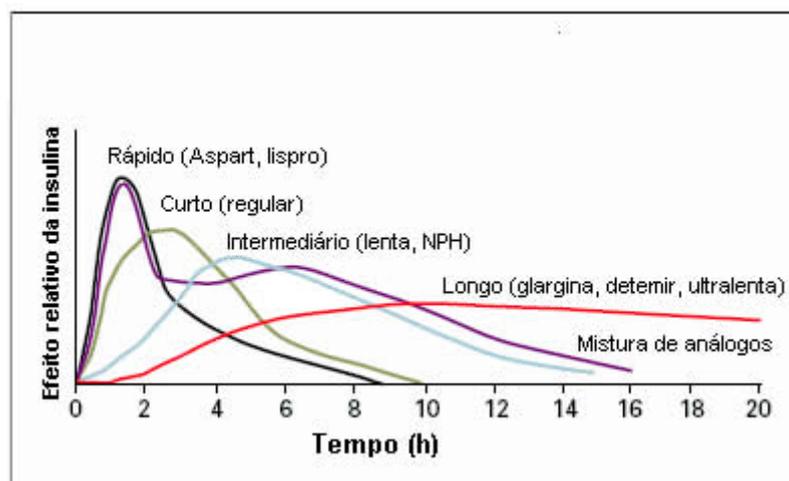


Figura 5. Tempo de ação de insulinas exógenas (adaptado de BRUNTON et al., 2005)

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas formam a base da medicina tradicional e são usadas há milhares de anos. A OMS estima que 80% da população mundial dos países em desenvolvimento utilize a medicina tradicional, principalmente as plantas, no cuidado primário à saúde. Produtos isolados de plantas também são de grande importância nos países em desenvolvimento assim como nos industrializados, não apenas como fármacos, mas como protótipos para outras moléculas (CHIVIAN, 2002). Cerca de 25% dos fármacos prescritos em todo mundo vêm de plantas, 50% são sintéticos cujos protótipos têm origem em compostos isolados de plantas medicinais e dos 252 fármacos considerados essenciais pela OMS, 11% são exclusivamente de origem vegetal (RATES, 2001).

Derivados de plantas com potencial atividade hipoglicêmica são utilizados na medicina popular e tradicional, com mais de 1200 espécies de plantas registradas em todo o mundo. Embora muitas destas plantas não possuam uma avaliação científica rigorosa, mais de 80% das espécies estudadas demonstram realmente atividade antidiabética (LEDUC et al., 2006). Muitos medicamentos modernos utilizados na medicina convencional têm origem nas plantas medicinais como é o caso da metformina, um medicamento amplamente utilizado no tratamento do diabetes e que foi isolado das flores da espécie *Galega officinalis*, da atropina obtida da *Atropa belladonna* L., morfina e codeína isoladas da espécie *Papaver somniferum* L., entre outras (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; SIMÕES et al., 2001; YEH, 2003; LEDUC et al., 2006).

No Brasil, apenas 20% da população é responsável por 63% do consumo de medicamentos sintéticos disponíveis, sendo que o restante encontra nos produtos de origem natural, principalmente nas plantas, a principal ou a única fonte de recursos terapêuticos (SIMÕES et al., 2001).

A Organização Mundial da Saúde incentiva à utilização de plantas medicinais para o tratamento de várias enfermidades, inclusive o diabetes, doença que atinge milhões de pessoas no mundo, especialmente em países onde o acesso aos tratamentos convencionais não são adequados (ABDEL-BARRY et al., 1997).

Apoiado no conhecimento e uso popular, a pesquisa e comprovação científica dos efeitos dos constituintes das plantas usadas na medicina tradicional como hipoglicemiantes,

tornam-se necessários, uma vez que estas substâncias podem servir como agentes hipoglicêmicos que mimetizam as ações da insulina. Desta forma, poderiam substituir as dolorosas injeções de insulina, um alívio para diabéticos do tipo 1 e minimizariam os efeitos colaterais dos agentes hipoglicemiantes orais no caso dos diabéticos do tipo 2 além de diminuir os elevados custos do tratamento para as pessoas de baixa renda (ABDEL-BARRY et al., 1997).

1.2.1 *Bauhinia forficata* Link

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal e utilizada popularmente no Brasil, destaca-se a *Bauhinia forficata*, planta pertencente à família Caesalpiniaceae (Leguminosae) e popularmente conhecida como “Pata-de-vaca” e “Unha-de-gato” (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; PEPATO et al., 2004).

Bauhinia forficata Link é uma árvore de médio porte (5 a 9 metros) cujas folhas são bipartidas lembrando a pata de uma vaca, tem flores de coloração branca e frutos do tipo vagem linear (Figura 6). É encontrada principalmente nas regiões do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, e destaca-se por apresentar propriedades hipoglicêmica, diurética e depurativa (MARTINS et al., 1998).



Figura 6. Espécie vegetal *Bauhinia forficata* Link: a) Árvore, b) Folhas bipartidas

Estudos fitoquímicos demonstraram que esta planta contém alcalóides, taninos, mucilagem, óleo essencial, heteroglicosídeos cianogênicos, saponinas, catecol e ácidos voláteis fixos (PEPATO et al., 2004).

Na literatura existem alguns relatos sobre a ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata*, com resultados comprovados cientificamente (PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002; CAZAROLLI et al., 2006). Os primeiros relatos da atividade hipoglicêmica de *Bauhinia forficata* em pacientes diabéticos foram feitos por Carmela Juliani em 1929 e 1931. Mais tarde, Juliani demonstrou que esta espécie vegetal continha compostos capazes de diminuir a glicemia de cães e coelhos submetidos à hiperglicemia adrenalítica e pancreatomizados (JULIANI, 1941). Caricati-Neto e colaboradores (1985) também observaram efeitos da *Bauhinia forficata* na glicemia quando a fração aquosa das folhas desta espécie vegetal foi administrada intraperitonealmente em ratos diabéticos.

Mais recentemente, Pepato e colaboradores (2002) verificaram que durante um tratamento crônico (31 dias) os ratos diabéticos tratados com o chá das folhas de *Bauhinia forficata* mostraram significativa redução na glicemia e nos níveis de glicose e uréia na urina, em relação ao grupo controle. Ainda em 2002, Silva e colaboradores observaram a redução dos níveis glicêmicos em ratos normais e diabéticos após a administração oral da fração *n*-butanólica das folhas desta espécie em um período agudo (3 horas). Em 2004, Lino e colaboradores mostraram que após a administração dos extratos aquoso, etanólico e hexânico da *Bauhinia forficata* por 7 dias em animais diabéticos, os mesmos apresentaram reduções significativas nos níveis de glicose plasmática, triglicérides, colesterol total e HDL colesterol.

Apenas Russo e colaboradores (1990) não encontraram diferença significativa nos níveis de glicose e de insulina entre os grupos de pacientes diabéticos do tipo 2 que receberam o placebo (*Imperata brasiliensis*, “sapé”) e o chá das folhas de *Bauhinia forficata* durante um tratamento agudo (0 a 6 horas) e crônico (1 a 56 dias).

Esses resultados demonstram que existem controvérsias quanto aos resultados obtidos, porém estes podem ser devido a vários aspectos tais como: tipo de solo, clima, condições de cultivo, armazenamento da planta e variações sazonais. Ainda devem ser observados tipos de forma e frações do extrato da planta e vias de administração utilizadas no ensaio (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; SILVA et al., 2002; DE SOUSA et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2006).

Várias espécies do gênero *Bauhinia* foram e estão sendo estudadas fitoquímica e farmacologicamente (DA SILVA; CECHINEL FILHO, 2002; PIZZOLATTI et al., 2003). Trabalhos sobre a composição fitoquímica da *Bauhinia forficata* demonstram que ela é caracterizada pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados nas folhas e flores sendo que são relatados na literatura a presença de β -sitosterol e canferol-3,7-diramnosídeo, sendo este último somente encontrado nas folhas da planta (DA SILVA et al., 2000). Pizzolatti e colaboradores (2003) realizaram o isolamento e a identificação do canferol e de mais cinco flavonóides glicosilados contendo os flavonóis canferol e quercetina como agliconas. Com o intuito de estudar os constituintes da *Bauhinia forficata* individualmente, De Sousa e colaboradores (2004) avaliaram a atividade aguda do composto majoritário da fração *n*-butanol das folhas da *Bauhinia forficata*, o canferol-3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (canferitrina). Após administração oral em animais normoglicêmicos e diabéticos foi observado significativo efeito hipoglicêmico e atividade antioxidante deste composto. Além disso, a canferitrina estimulou significativamente a captação de [¹⁴C]-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos sem alterar a síntese protéica e também não alterou os níveis de glicose urinária num período agudo de tratamento (JORGE et al., 2004).

1.2.2 *Cyathea phalerata*

O gênero *Cyathea* é constituído de samambaias arborescentes que variam de 4 a 8 m de altura e estão amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 7). Diversas espécies são utilizadas no tratamento de doenças sexualmente transmissíveis e como anti-helmíntico (ARAI et al., 1994; ARAI et al., 1995, BRINGMANN et al., 1999). Ameríndios da Bolívia e Equador fazem uso da espécie *Cyathea pungens* como antiinflamatório (MACÍA, 2004) e no México a infusão de raízes e folhas da espécie *Cyathea fulva* é utilizada como hipoglicemiante, porém sem nenhuma comprovação científica desta atividade (ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005).

As samambaias apresentam quatro tipos principais de flavonóides: flavonóis, C-glicosilflavonas, flavonas e flavanonas. Outros tipos conhecidos de forma mais esporádica são as chalconas, antocianinas, xantonas, flavanonóis e biflavonas (WALLACE, 1989). A primeira investigação sobre os constituintes flavonóides no gênero *Cyathea* (*Cyatheaceae*) foi realizada por Harada et al. (1955, 1958) que analisou as folhas de *Cyathea fauriei* e *Cyathea*

hancockii durante um levantamento sobre a distribuição de flavonas, flavonóis e flavanonas nas samambaias japonesas. De acordo com esse estudo as espécies continham canferol, cirtominetina, farrerol e vitexina (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975). Soeder e Bass (1972) também demonstraram a presença de flavonas C-glicosídeos (vitexina e isovitexina) nas folhas de três espécies do gênero *Cyathea* da América Latina (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975).

Espécies representantes da família Cyatheaceae acumulam flavonóis O-glicosídeos, predominantemente 3-O-glicosídeos do canferol e quercetina e C-glicosilflavonas e flavanonas (HIRAOKA; HASEGAWA, 1975; HIRAOKA; MAEDA, 1979; WALLACE, 1989). Além desses compostos encontram-se constituintes triterpenóides e esteróides em determinadas espécies do gênero *Cyathea* (ARAI et al., 1994; ARAI et al., 1995; BRINGMANN et al., 1999). No entanto, pouco se conhece ainda sobre a fitoquímica do gênero *Cyathea*, havendo até o momento escassa literatura a respeito. Os poucos estudos realizados mostram que o gênero é caracterizado fitoquimicamente pelo acúmulo de triterpenos hopanóides e fERNANOS e compostos flavonoídicos glicosilados (CUNHA et al., 2003).



Figura 7. Espécie vegetal *Cyathea phalerata*

No estudo fitoquímico de *Cyathea phalerata* realizado por Cunha et al. (2003) foram isolados e caracterizados dois flavonóides glicosídeos; o canferol 3-O- α -L-ramnopiranosil β -D-glicopiranosídeo (canferol-3-neohesperidosídeo) e o ácido-3-O- β -D-glicopiranosil caféico.

Popularmente conhecida como xaxim, *Cyathea phalerata* é utilizada na medicina popular regional para o tratamento de afecções renais, amarelão, reumatismo e gripes, porém sem comprovação científica (CUNHA et al., 2003).

A partir dos resultados obtidos com a espécie *Bauhinia forficata* em relação ao potencial hipoglicemiante e sabendo-se que esta se caracteriza pelo acúmulo de flavonóides do tipo canferol muito semelhante ao constituinte canferol-3-neohesperidosídeo isolado do caule fresco da *Cyathea phalerata* foi pesquisado também a atividade hipoglicemiante deste flavonóide (JULIANI, 1929, 1931, 1941; DA SILVA et al., 2000; PEPATO et al., 2002; SILVA et al., 2002; PIZZOLATTI et al., 2003; DE SOUSA et al., 2004; LINO et al., 2004; CAZAROLLI et al., 2006). O canferol da *Cyathea phalerata* se mostrou eficaz em diminuir a glicemia de ratos diabéticos após tratamento agudo pelas vias oral nas doses de 50 e 100 mg/kg e intraperitoneal com a dose de 100 mg/kg. Quando complexado com o íon vanádio (IV) este composto demonstrou um pronunciado efeito hipoglicêmico em todo o tempo estudado. Este efeito foi maior do que o observado com a canferitrina da *Bauhinia forficata* e do canferol-3-neohesperidosídeo livre, após 3 horas, pela via intraperitoneal (CAZAROLLI et al., 2006).

1.2.3 Flavonóides

Os flavonóides constituem um grupo de polifenóis de baixo peso molecular, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. A estrutura é baseada no núcleo flavonoídico (Figura 8), o qual é formado de três anéis fenólicos denominados A, B e C. Ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados e são divididos em classes de acordo com o nível de oxidação do anel C, as quais incluem as antocianidinas, flavanóis (catequinas), flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas entre outras (HAVSTEEN, 1983; AHERNE et al., 2002; HEIM et al., 2002).

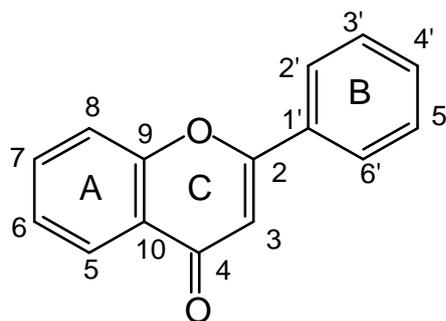


Figura 8. Núcleo fundamental dos flavonóides

São amplamente distribuídos em folhas, sementes, caule e flores das plantas, onde conferem proteção contra radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros. Estão presentes em vegetais, frutas e sucos, no entanto, a ingestão diária varia conforme a região geográfica e cultura (AHERNE et al., 2002; HEIM et al., 2002). Os flavonóides ingeridos são absorvidos no estômago e intestino delgado e são metabolizados principalmente pelo fígado e secundariamente na mucosa intestinal, túbulos renais, pulmões, pele e placenta e excretados na urina e fezes (ONG; KHOO, 2000; AHERNE et al., 2002).

Flavonóides e seus derivados são bastante explorados em função das inúmeras aplicações terapêuticas que apresentam como: ações antialérgica, anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-cancerígena, anti-viral e anti-ulcerogênica (HAVSTEEN, 1983; LARSON, 1988; ONG; KHOO, 1996; HAVSTEEN, 2002).

Existem diversos trabalhos demonstrando o efeito anti-diabético e as ações no metabolismo da glicose exercido pelos flavonóides. O tratamento subcrônico de ratos diabéticos com luteolina-5-O- β -rutinosídeo levou à diminuição dos níveis sanguíneos de glicose (ZARZUELO et al., 1996). Diversos derivados do flavonóide crisina também demonstraram efeito hipoglicemiante (SHIN et al., 1999). A epigallocatequina galato apresentou ação hipoglicemiante através da redução da produção de glicose hepática e da inibição de genes que controlam a gliconeogênese (WALTNER-LAW et al., 2002; ANTON et al., 2006). A isoflavona genisteína demonstrou efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos além de aumentar os níveis de insulina e da enzima glicocinase (LEE, 2006). Hesperidina e naringina reduziram os níveis de glicose sanguínea aumentando a glicólise hepática e a concentração de glicogênio ou diminuindo a gliconeogênese (JUNG et al., 2004). A

administração de puerarina e canferitrina em ratos normais e diabéticos diminuiu a concentração de glicose plasmática e aumentou a captação de glicose no músculo sóleo (HSU et al., 2003; DE SOUSA, 2004; JORGE, 2004). De maneira semelhante, procianidinas apresentaram efeito anti-hiperglicêmico e atividade insulino-mimética através do aumento da captação de glicose em células musculares e adiposas (PINENT et al., 2004). A miricetina exerce ação hipoglicêmica mimetizando as ações da insulina, regulando os níveis glicêmicos e influenciando no metabolismo e estoque de glicogênio hepático (ONG; KHOO, 1996, 2000). A quercetina atua normalizando os níveis de glicose plasmática, aumentando o conteúdo de glicogênio hepático e induzindo as enzimas glicocinase e hexocinase hepáticas (VESSAL et al., 2003; SHETTY et al., 2004). A administração da rutina em animais diabéticos diminuiu os níveis de glicose sanguínea e aumentou os níveis de insulina, peptídeo-C e proteínas. Além disso, houve uma melhora no conteúdo de glicogênio e atividade de enzimas do metabolismo de carboidratos (KAMALAKKANNAN; PRINCE, 2006; PRINCE; KAMALAKKANNA, 2006). O tratamento de pacientes com resistência insulínica com o anti-oxidante silimarina resultou na diminuição dos níveis de glicose sanguínea e de insulina (VELUSSI et al., 1997). Floridzina atua reduzindo a glicose sanguínea através da inibição da captação intestinal, reabsorção renal e aumento da captação de glicose pelo tecido adiposo (ZHAO et al., 2004).

2 JUSTIFICATIVA

O Diabetes Melito é uma doença séria com múltiplas complicações e mortalidade precoce que afeta aproximadamente 170 milhões de pessoas em todo o mundo. Só no Brasil são mais de 5 milhões de diabéticos, sendo 90% diabéticos do tipo 2. O governo tem financiado o tratamento dessa patologia, no entanto, não tem atingido de forma satisfatória a população alvo devido ao alto custo para manutenção deste tipo de programa.

Terapias alternativas como o uso de plantas medicinais se tornou uma prática cada vez mais difundida em função do baixo custo e fácil obtenção. Desta forma, a pesquisa de substâncias obtidas de plantas com ações que mimetizem ou potencializem as ações da insulina é de grande importância para o desenvolvimento de novos fármacos.

A *Bauhinia forficata* Link é uma destas plantas, conhecida popularmente como hipoglicemiante. Resultados anteriores deste laboratório mostraram que a fração *n*-butanólica, rica em flavonóides glicosilados, teve efeito hipoglicemiante após tratamento agudo em ratos diabéticos sem alterar a curva de tolerância à glicose (SILVA et al., 2002). Desta fração foram isolados, purificados e identificados três canferóis, entre eles, o majoritário, canferitrina (PIZZOLATTI et al., 2003). A curva dose-resposta deste composto mostrou um efeito hipoglicemiante significativo em ratos diabéticos em todos os tempos e doses estudados (DE SOUSA et al., 2004). O estudo deste composto em ratos normoglicêmicos e diabéticos revelou uma ação significativa na captação de glicose no músculo sóleo, não influenciou a síntese protéica *in vitro* e não interferiu na glicosúria após tratamento por via oral. Estes resultados mostraram um efeito agudo da canferitrina percentualmente tão eficaz quanto da insulina embora utilizada em doses mais altas do que o hormônio purificado (JORGE et al., 2004).

A *Cyathia phalerata* é outra planta utilizada na medicina popular e que foi caracterizada por apresentar flavonóides glicosilados. Cunha et al. (2003) isolaram dois flavonóides desta espécie sendo o canferol-3-neohesperidosídeo o majoritário. Este composto, semelhante à canferitrina, demonstrou um efeito hipoglicemiante em animais

diabéticos pelas vias oral e intraperitoneal. Além disso, quando complexado com o íon vanádio (IV) apresentou efeito hipoglicemiante significativo pela via intraperitoneal em todos os tempos estudados, sendo que este complexo apresentou 83% de biopotência comparado à insulina e foi mais potente que o vanádio livre, que o composto pela mesma via e que o complexo canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo-VO(IV) (CAZAROLLI et al., 2006).

Apoiado nestes resultados, o mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo, um flavonóide glicosilado com comprovado efeito hipoglicemiante, foi estudado em um tecido alvo da insulina, o músculo sóleo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito de flavonóides glicosilados na glicemia de ratos diabéticos e o mecanismo de ação do composto canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudar o efeito de flavonóides glicosilados obtidos das folhas da *Bauhinia forficata*, na glicemia de ratos diabéticos.

Estudar o efeito de flavonóides na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose e comparar com o efeito estimulatório da insulina na captação de glicose no músculo sóleo de ratos normoglicêmicos.

Estudar o efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos normoglicêmicos (curva de dose-resposta).

Comparar o efeito agudo do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose com a ação estimulatória da insulina no músculo sóleo de ratos normoglicêmicos.

Estudar o mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose no músculo sóleo.

Estudar a influência da síntese protéica no efeito agudo do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos normoglicêmicos.

Estudar o efeito do canferol-3-neohesperidosídeo no conteúdo de glicogênio no músculo sóleo de ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes

Aloxana: Monohidrato de aloxana 98% obtida da Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA.

Cicloheximida: 3-[2-(3,5-Dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxi-etil] glutarimida, obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

Flavonóides quercetina e canferol: foram obtidos por hidrólise das formas glicosiladas isoladas das folhas da *Bauhinia forficata*.

Glicose PAP: Kit utilizado na dosagem da glicemia pelo método enzimático da glicose oxidase da Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil.

Insulina: Insulina Regular Humana (Biohulin) 100 UI/mL produzida pela Biobrás, Montes Claros, MG.

Líquido de Cintilação Miscível: para a contagem da radioatividade das alíquotas utilizou-se o líquido de cintilação Optiphase 'hifase' 3, adquirido da Pelkin Elmer Life and Analytical Sciences, Finland.

LY294002: Cloridrato (2-(4-Morpholinil)-8-phenil-4H-1-benzopiran-4-one), inibidor seletivo da PI-3K, obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

NH₄Cl saturado: utilizado para neutralizar o precipitado de glicogênio obtido da Merck® AG, Darmstadt Germany.

PD98059: (2-(2-Amino-3-Metoxifenil)-4H-1-Benzopira-4-ona), inibidor da MEK, obtido da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA).

RO318220: Inibidor seletivo de PKC, obtido da Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, EUA).

[U-¹⁴C]-2-deoxi-D-glicose: Utilizou-se a glicose uniformemente marcada nos experimentos de captação de glicose, com atividade específica de 7,4 Gbq/mmol. Obtido da Pelkin Elmer Life and Analytical Sciences, Albany Street, Boston, MA.

Etanol absoluto, éter etílico, dimetilsulfóxido (DMSO): Todos reagentes P.A. da Merck® AG, Darmstadt Germany.

4.1.2 Soluções

Aloxana: Monohidrato de aloxana 98% em solução fisiológica (NaCl 0,9%) na concentração de 5%.

KOH 33%: 33 g de KOH dissolvidos em 100 mL de água.

LY294002: 0,3 mg do pó dissolvido em 1 mL de DMSO, concentração final de 0,98 mM.

PD 98059: 1 mg do pó dissolvido em 0,935 mL de DMSO, concentração final de 4 mM.

RO318220: 1 mg do pó dissolvido em 0,903 mL de água miliQ, concentração final de 2 mM.

Solução estoque do canferol-3-neohesperidosídeo 0,2 mM: 1,1 mg do flavonóide dissolvido em 9 mL de tampão KRb.

Solução estoque do canferol-3-neohesperidosídeo 1,0 µM: 50 µL da solução estoque 0,2 mM solubilizado em 9,95 mL de tampão KRb.

4.1.3 Equipamentos utilizados

Balança eletrônica Bioprecisa FA 2104N (Capacidade 0-210 g e precisão 0,1 mg): Utilizada para pesagem de reagentes, compostos e músculos dos animais.

Balança eletrônica Toledo 9094 (Capacidade 20 – 3000 g): Utilizada para pesagem dos animais.

Banho metabólico com agitação (Quimis): Aparelho termostatizado com atmosfera úmida.

Centrífuga baby Fanem: Para separação do soro das amostras de sangue coletadas e centrifugação dos homogenatos.

Espectrofotômetro UV/Visível (TechComp modelo 8500): Utilizado para leitura das dosagens de glicose.

Espectrômetro de cintilação líquida (LKB modelo 1209 – Rack-Beta): Utilizado para contagem da radioatividade com eficiência de 85-90%.

Medidor de pH (modelo Digimed DM20): para monitoração do pH em todas as soluções, calibrado no momento do uso.

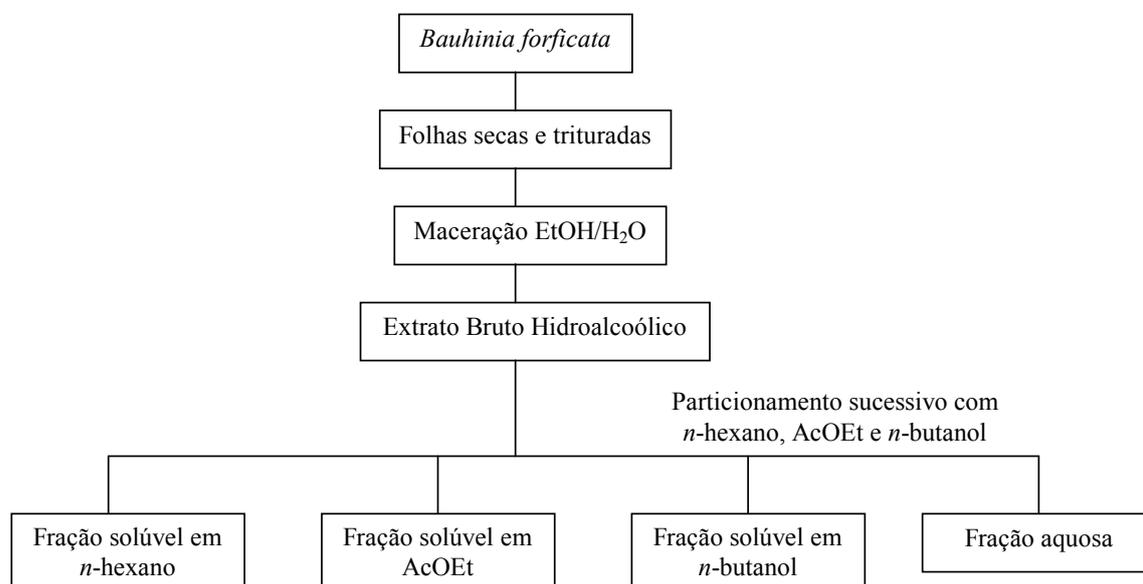
4.1.4 Obtenção de compostos naturais da espécie *Bauhinia forficata* Link

4.1.4.1 Coleta e identificação da planta

As folhas de *Bauhinia forficata* foram coletadas em novembro de 1998 na cidade de Orleans no sul do estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pelo Professor Daniel de Barcellos Falkenberg do Departamento de Botânica da UFSC, onde uma exsicata da espécie foi depositada sob o número FLOR-31271.

4.1.4.2 Preparação do extrato bruto e frações

As folhas (960 g) secas e trituradas foram maceradas com EtOH/H₂O (8:2) à temperatura ambiente em dois ciclos de 14 dias. O extrato hidroalcoólico foi evaporado em rotavapor sob pressão reduzida a 50 °C até ¼ de seu volume inicial e mantido em repouso por dois dias a 4 °C. Em seguida, esta solução foi filtrada em papel filtro e o filtrado foi submetido a um particionamento sucessivo com *n*-hexano, AcOEt, e *n*-BuOH. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para a obtenção das respectivas frações hexano, acetato de etila e *n*-butanol do extrato das folhas (Fluxograma 1).

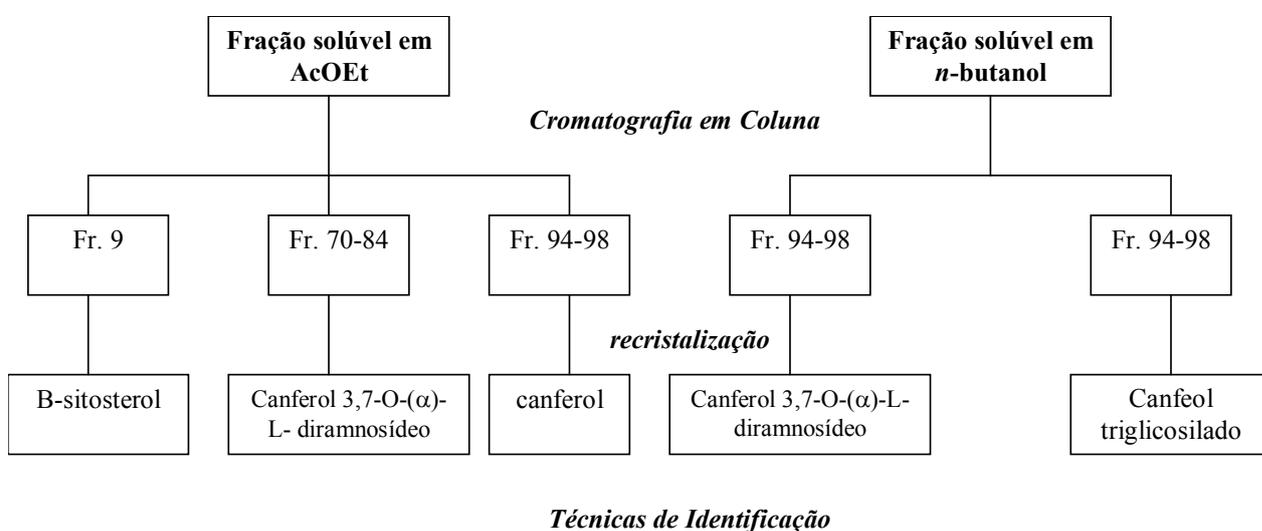


Fluxograma 1. Representação esquemática do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico da *Bauhinia forficata*

4.1.4.3 Isolamento dos flavonóides das folhas

Conforme descrito por Pizzolatti et al. (2003) com algumas modificações, a fração AcOEt das folhas (16,13 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna (CC) de sílica gel usando como eluente o sistema *n*-hexano/AcOEt/metanol com polaridade crescente. Desta fração obteve-se 83 mg do canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo, após recristalizações em AcOEt. A fração *n*-BuOH das folhas (11,8 g) foi submetida ao mesmo

procedimento descrito acima e forneceu 300 mg de canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo após recristalização em metanol. Posteriormente as frações foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD) e nesta análise foram encontrados 5 compostos: canferol, canferol-3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (canferitrina) (aproximadamente 383 mg), canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (canferol triglicosilado), quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo e quercetina 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo como representado no fluxograma 2.



Fluxograma 2. Representação esquemática do processo de obtenção dos compostos a partir das frações solúveis

4.1.4.4 Caracterização dos compostos

Os compostos isolados foram identificados através de técnicas de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massas (PIZZOLATTI et al., 2003).

É importante ressaltar que os procedimentos de coleta, fracionamento e caracterização dos compostos utilizados nesta dissertação estiveram sob a responsabilidade e coordenação do Professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, não havendo participação direta da mestranda nesta etapa.

4.1.4.4.1 Compostos majoritários das folhas da *Bauhinia forficata*

Composto: canferol (aglicona).

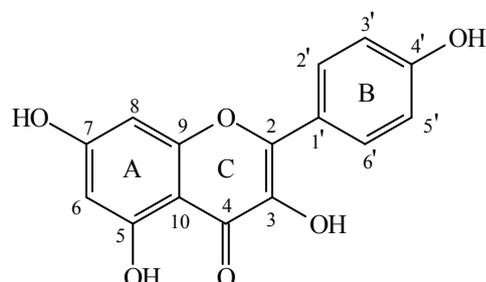


Figura 9. Estrutura química do composto canferol

Compostos: canferitrina e quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo.

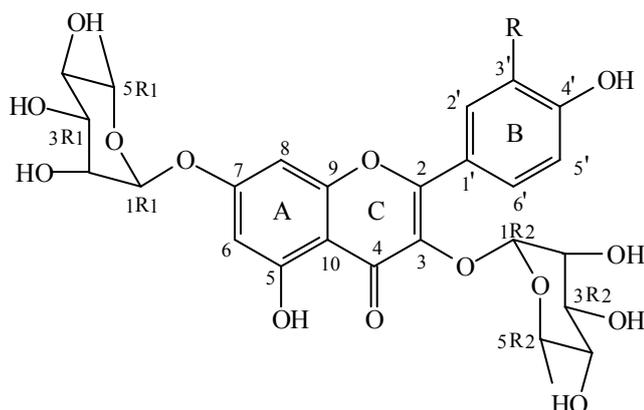


Figura 10. Estrutura química dos compostos canferitrina (R = H) e quercetina 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo (R = OH)

Compostos: canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo e quercetina 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo.

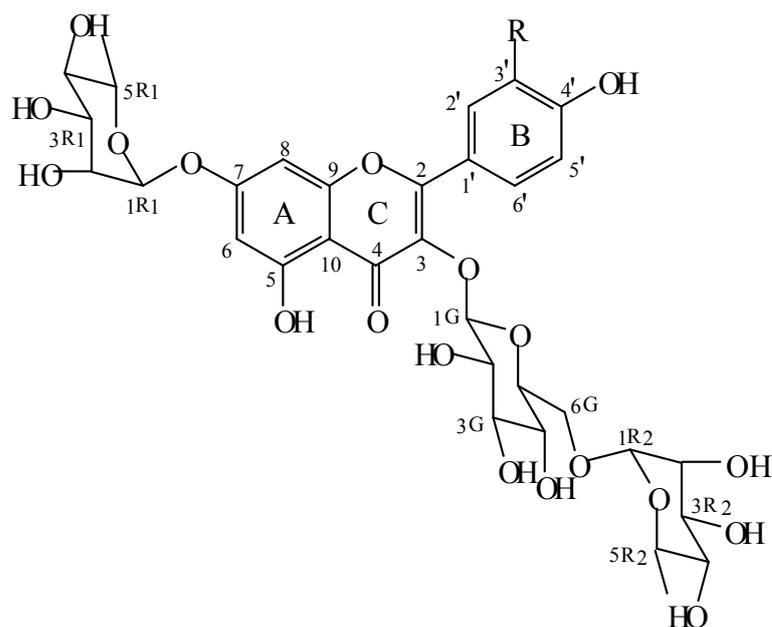


Figura 11. Estrutura química dos compostos canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (R = H) e quercetina 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (R = OH)

4.1.5 Obtenção de compostos naturais da espécie *Cyathea phalerata*

4.1.5.1 Coleta e identificação

Os caules da espécie vegetal foram coletados em abril de 2002 na localidade de Alto Aririu, município de Palhoça no estado de Santa Catarina. A planta foi identificada pela Professora Lana Silvestre do Departamento de Botânica da UFRJ, onde a exsicata da espécie foi depositada sob o número RBR-4287.

4.1.5.2 Preparação do extrato bruto e frações

O extrato etanólico aquoso e o precipitado do extrato bruto foram obtidos a partir do caule fresco por maceração exaustiva com EtOH à temperatura ambiente. O extrato etanólico

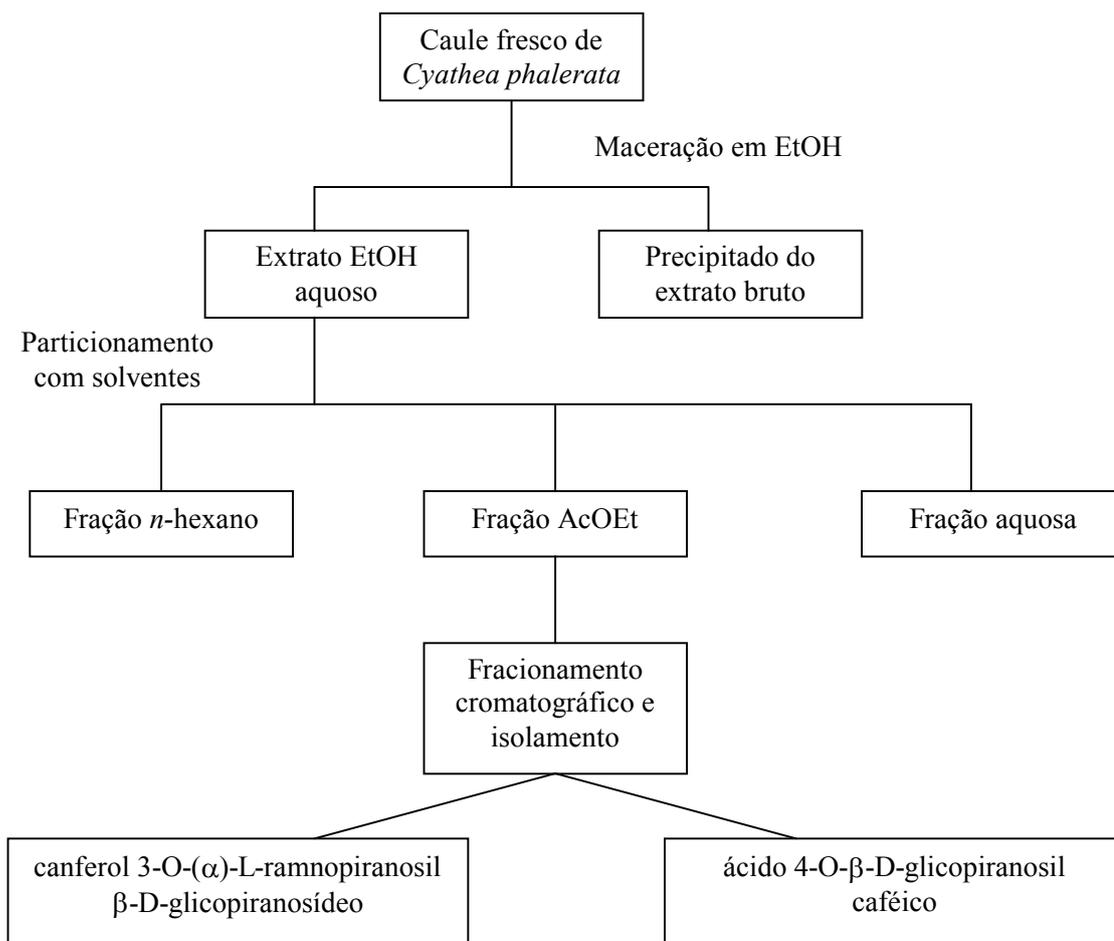
aquoso foi submetido a um particionamento líquido-líquido com *n*-hexano e AcOEt. O solvente de cada fase orgânica foi evaporado para obtenção das respectivas frações.

4.1.5.3 Isolamento dos flavonóides

A fração AcOEt foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, utilizando como eluente misturas de hexano, acetato de etila e etanol com gradiente de polaridade crescente. As frações recolhidas foram analisadas em CCD, seguido de purificação por recristalização. Através deste processo verificou-se a presença de 2 compostos nesta fração: canferol 3-O-(α)-L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo (canferol-3-neohesperidosídeo) e ácido 4-O- β -D-glicopiranosil caféico.

4.1.5.4 Caracterização dos compostos

Os compostos isolados foram identificados através das técnicas de espectroscopia de infravermelho, massa, ressonância magnética de ^1H e ^{13}C , APT e HETCOR e por comparação com os dados da literatura. O fluxograma 3 representa esquematicamente os procedimentos experimentais para obtenção dos compostos a partir do caule de *Cyathea phalerata*.



Fluxograma 3. Representação esquemática da obtenção dos compostos a partir do caule de *Cyathea phalerata*

4.1.5.4.1 Compostos majoritários isolados do caule fresco da espécie *Cyathea phalerata*

Composto: canferol 3-O-(α)-L-ramnopiranosil β -D-glicopiranosídeo (canferol-3-neohesperidosídeo).

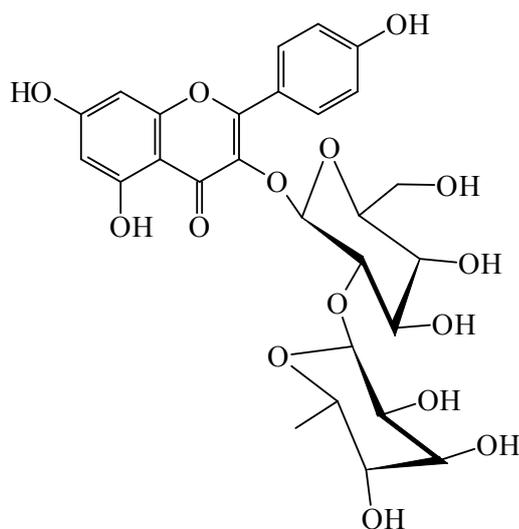


Figura 12. Estrutura química do composto canferol-3-neohesperidosídeo

Composto: ácido 4-O- β -D-glicopiranosil cafêico.

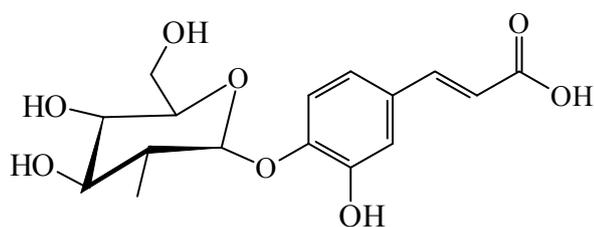


Figura 13. Estrutura química do composto ácido 4-O- β -D-glicopiranosil cafêico

4.2 MÉTODOS

4.2.1 *Animais*

Foram utilizados ratos machos adultos (linhagem Wistar) entre 50-55 dias de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas e alimentados com ração comercial e água à vontade em sala climatizada com ciclo claro/escuro (06-18 h luzes acesas/ 18-06 h luzes apagadas).

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo 343/CEUA/UFSC, parecer favorável n°. 23080.009494/2005-63/UFSC aprovado na reunião de 08/06/2005.

4.2.2 *Diabetes experimental*

Existem várias técnicas para a indução do diabetes experimental, as quais incluem: destruição química das células β pancreáticas, remoção cirúrgica da massa de células β ou pancreatectomia, injúria ao hipotálamo ventromedial, dietas ricas em açúcares, gorduras, má nutrição *in utero*, altas doses de hormônios contra-regulatórios como os glicocorticóides ou exposição prolongada à hiperinsulinemia (ISLAS-ANDRADE et al., 2000).

Diferentes agentes químicos são capazes de induzir o diabetes; os dois mais utilizados são a estreptozotocina (2-deoxi-2-(3-metil-3-nitrosoureído)-D-glicopiranosose) e a aloxana (2,4,5,6-tetraoxohexahidropirimidina) (ISLAS-ANDRADE et al., 2000; VERSPOHL, 2002). A utilização destes compostos proporciona alterações morfológicas e funcionais das células secretoras de insulina levando à perda do controle hormonal sobre o metabolismo de carboidratos (FISCHER, 1985).

Neste trabalho o diabetes foi induzido através de uma única injeção intravenosa de monohidrato de aloxana 5% em solução fisiológica (NaCl 0,9%) na dose de 50 mg/kg de peso corporal pela veia dorsal do pênis dos animais sob anestesia etérea. Esta solução foi sempre preparada imediatamente antes do uso. Três dias depois foi coletado sangue para dosagem da glicemia e confirmação do diabetes. Foram considerados diabéticos apenas ratos que apresentavam glicemia a partir de 300 mg/dL. A figura 14 mostra o procedimento utilizado para indução do diabetes experimental.



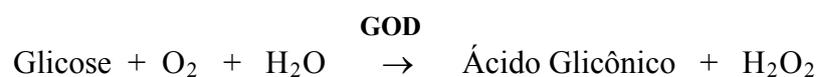
Figura 14. Indução do diabetes através da injeção intravenosa de aloxana na veia dorsal peniana

4.2.3 *Coleta do sangue e determinação da glicemia*

Todos os animais estavam em jejum de 16 h antes da coleta de sangue. Para a determinação da glicemia em todos os tempos estudados o sangue foi coletado por capilaridade pelo plexo retro-orbital em tubos de eppendorf. Depois de centrifugado, alíquotas de 10 μ L de soro (em duplicatas) foram utilizados para dosar a glicose pelo método enzimático da glicose oxidase (GLICOSE PAP da LABTEST). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37 °C e as absorbâncias foram lidas em um espectrofotômetro da marca TechComp modelo 8500 em 505 nm. Todas as dosagens glicêmicas foram feitas dentro de uma hora após a coleta do sangue. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Princípio do método segundo descrito por VARLEY et al. (1976).

A glicose oxidase (GOD) catalisa a oxidação da glicose de acordo com a seguinte reação:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol sob ação catalisadora da peroxidase (POD), através de uma reação de acoplamento oxidativo que forma um produto de coloração vermelha (antipirilquinonimina) cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra.



O resultado é obtido através da fórmula:

$$\text{Glicose} = \frac{\text{Absorbância teste}}{\text{Absorbância padrão}} \times 100$$

4.2.4 *Ensaio biológico in vivo*

4.2.4.1 *Ensaio para avaliação do efeito do canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo (canferol triglicosilado) na glicemia de ratos diabéticos*

Ratos diabéticos foram mantidos em jejum de 16 horas. Os animais foram divididos em grupos controles e tratados. Os animais tratados receberam o canferol triglicosilado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg pela via oral e as doses de 100 e 200 mg/kg pela via intraperitoneal. Foram coletadas amostras de sangue para determinação da glicemia nos tempos 0, 1, 2 e 3 h após a administração do composto.

4.2.4.2 Ensaios para avaliação do efeito do canferol-3-neohesperidosídeo no conteúdo de glicogênio de ratos diabéticos

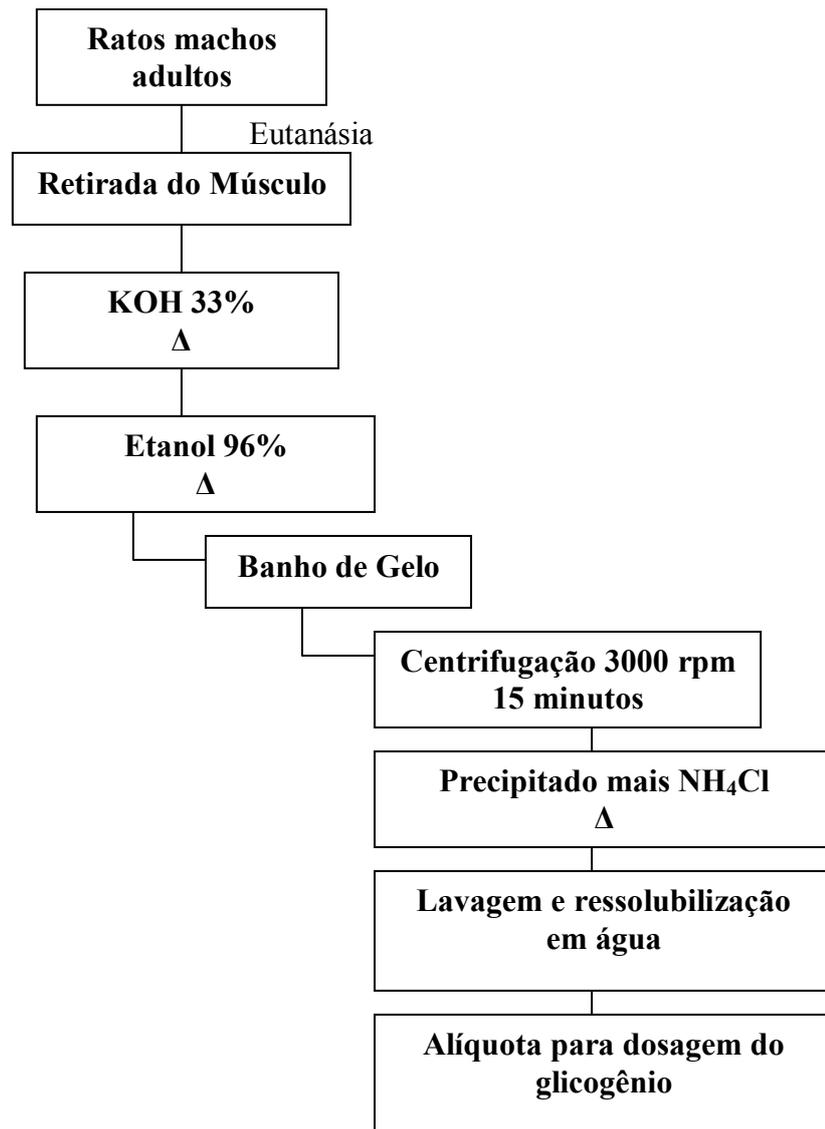
4.2.4.2.1 Tratamento dos animais

Os ratos normais e diabéticos foram divididos em diferentes grupos controles e tratados. Os animais controles foram subdivididos em I-Controle normal alimentado, II-Controle normal em jejum (16 h), III-Controle hiperglicêmico (após jejum de 16 h recebeu 4 g/kg de glicose por via oral) e IV-Controle diabético (aloxana 50 mg/kg i.v.). Os animais tratados foram subdivididos em V- Hiperglicêmicos (receberam insulina 0,5 UI i.p.) e VI-Diabéticos (receberam o canferol-3-neohesperidosídeo na dose 100 mg/kg por via oral).

Os animais hiperglicêmicos tratados com insulina foram eutanasiados após 3 h do tratamento e os animais diabéticos tratados com canferol-3-neohesperidosídeo foram eutanasiados após 24 h do tratamento. Em seguida, foi retirado o músculo sóleo para extração e medida do conteúdo de glicogênio.

4.2.4.2.2 Extração e medida do conteúdo de glicogênio muscular

O glicogênio muscular foi extraído conforme descrito por Krisman (1962) com algumas modificações. O tecido foi pesado, homogeneizado com KOH 33% e fervido a 100 °C por 20 min, com agitação ocasional para a completa dissolução. Após resfriamento, etanol 96% foi adicionado às amostras que foram novamente aquecidas até o aparecimento de pequenas bolhas e resfriadas em banho de gelo para precipitação do glicogênio. Os homogenatos foram centrifugados em tubos cônicos a 3.000 rpm por 15 min e o precipitado resultante foi neutralizado com cloreto de amônio saturado, aquecido novamente por 5 min, lavado e ressolubilizado em água (Fluxograma 4). O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo Krisman (1962) utilizando-se uma solução de iodo e as medidas de absorvância foram feitas em 460 nm. Os resultados foram expressos como mg de glicogênio/g de tecido.



Fluxograma 4. Extração do glicogênio muscular

4.2.5 Ensaios biológicos *in vitro*

4.2.5.1 Ensaios da captação de glicose no músculo sóleo

Para os experimentos de pré-incubação e incubação do músculo sóleo com o radioisótopo foi sempre utilizado o tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb). Esta solução foi utilizada como meio de incubação em todos os ensaios *in vitro* e foi preparada imediatamente

antes do experimento. A preparação da solução foi feita a partir das seguintes soluções estoques:

Tabela 1. Soluções estoques utilizadas para o preparo do KRb

CaCl ₂ .H ₂ O	2,50 mM
KH ₂ PO ₄	1,19 mM
MgSO ₄ . H ₂ O	0,76 mM
NaHCO ₃	25,00 mM
NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM

Após o preparo da solução-tampão, esta foi gaseificada com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v), monitorada através de um pHmetro até que atingisse o pH 7,4. A solução foi mantida em gelo durante o experimento.

Tabela 2. Concentrações iônicas do KRb no líquido intra e extracelular

Meio mEq/L	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HCO ⁻³	HPO ⁻⁴	Cl ⁻	SO ⁻⁴
Extracelular	140-145	4-5	2,5	1,5	27	1,0	100	-
Intracelular	10	145-150	2,0	4,0	8	65-70	5-20	-
KRb	146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127	1,2

4.2.5.2 *Ensaio para determinação da curva de dose-resposta do canferol-3-neohesperidosídeo*

Foram utilizados ratos Wistar machos normais. Os animais, em jejum, foram decapitados, o músculo sóleo foi removido e imediatamente colocado em placa de Petri, em gelo, contendo o tampão KRb em pH 7,4. Após dissecação e limpeza do tecido conjuntivo os músculos direito e esquerdo foram pesados e alternadamente incubados nos grupos controles e tratados (JORGE et al., 2004). Para a curva de captação de [¹⁴C]Deoxi-D-Glicose ([¹⁴C]DG)

os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em 1 mL do tampão KRb (controles) e 1 mL de KRb mais o canferol-3-neohesperidosídeo (tratados) em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v) e posteriormente incubados por 1 h em novo tampão KRb contendo 0,1 μCi/mL de [¹⁴C]DG acrescido do canferol-3-neohesperidosídeo nas concentrações 0,0001; 0,001; 0,1; 1; 10; 20; 200; 520; 1040; 1580 e 2080 μM (Fluxograma 5).



Fluxograma 5. Representação esquemática do ensaio de captação de [¹⁴C]DG no músculo sóleo incubado para a curva de dose-resposta com composto canferol-3-neohesperidosídeo

4.2.5.3 Ensaios para medida da captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose utilizando inibidores da PI-3K, PKC, MEK e síntese protéica

Para a curva de captação de [¹⁴C]DG os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em 1 mL do tampão KRb ou 1 mL de KRb acrescido de canferol-3-neohesperidosídeo (1,0 nM) ou dos inibidores da PI-3K (LY294002; 10 µM) (SHEPHERD et al., 1997; NISHITANI et al., 2002), da PKC (RO318220; 40 µM) (AVIGNON et al., 1996; RODRIGUEZ et al., 2004) de MEK (PD98059; 50 µM) (DAVIES et al., 2000; HARMON et al., 2004) ou da síntese protéica (Cicloheximida; 0,35 mM) (ZAMONER et al., 2005; MENEGAZ et al., 2006) em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v). Posteriormente os músculos foram incubados por 1 h em novo tampão KRb contendo 0,1 µCi/mL de [¹⁴C]DG apenas ou acrescido do canferol-3-neohesperidosídeo ou canferol-3-neohesperidosídeo mais um dos inibidores (LY294002, RO318220, PD98059 ou Cicloheximida), conforme demonstrado no fluxograma 6.

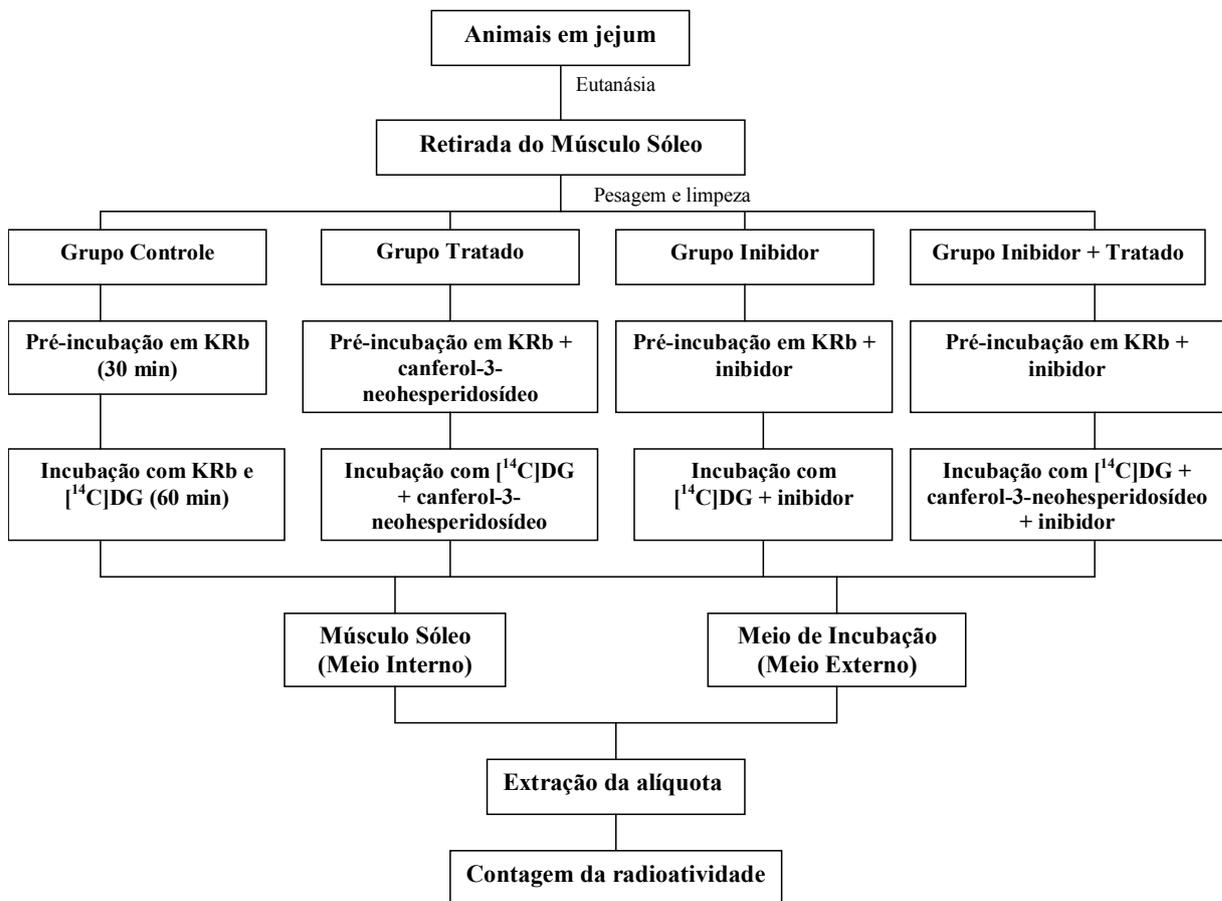
4.2.5.4 Ensaio para determinação do efeito sinérgico da insulina e canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose

A solução de canferol-3-neohesperidosídeo (1,0 nM) utilizada neste ensaio e nos seguintes foi sempre preparada no dia do experimento a partir de uma solução estoque de 1,0 µM deste composto, num volume mínimo de 10 mL.

Para a curva de captação de [¹⁴C]DG os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em 1 mL do tampão KRb ou 1 mL de KRb acrescido de canferol-3-neohesperidosídeo (1,0 nM) ou de insulina (1,0 UI) ou ambos em um agitador metabólico a 37 °C em atmosfera de carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v). Posteriormente os músculos foram incubados por 1 h em novo tampão KRb acrescido de 0,1 µCi/mL de [¹⁴C]DG apenas ou contendo os mesmos compostos da pré-incubação.

4.2.5.5 Ensaio para determinação do efeito da quercetina e da insulina na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose

Para a curva de captação de ^{14}C]DG os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em 1 mL do tampão KRb ou 1 mL de KRb acrescido de quercetina (0,1 e 1,0 mM) ou de insulina (1,0 UI; 7,0 nM). Posteriormente, os músculos foram incubados por 1 h em novo tampão KRb contendo de 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C]DG apenas ou acrescido de quercetina, insulina ou ambos.



Fluxograma 6. Representação esquemática do ensaio de captação de ^{14}C]DG no músculo sóleo incubado com composto canferol-3-neohesperidosídeo (1,0 nM) e com inibidores da PI-3K, PKC, MEK e da síntese protéica

4.2.5.6 Ensaio para determinação do efeito do canferol (aglicona) na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose

Para a curva de captação de [^{14}C]DG os músculos foram pré-incubados durante 30 minutos em 1 mL do tampão KRb ou 1 mL de KRb acrescido de canferol (1,0 mM) ou de DMSO (10%). Posteriormente, os músculos foram incubados por 1 h em novo tampão KRb contendo 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^{14}C]DG apenas ou acrescido de canferol ou de DMSO.

4.2.5.7 Processamento das amostras

Após a incubação, os músculos foram retirados do meio, secos em papel filtro umedecido em KRb gelado, para remoção do excesso de radioativo e transferidos para frascos com tampa contendo 1 mL de água destilada. Estes frascos foram congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente fervidos durante 10 minutos com o objetivo de atingir o equilíbrio completo da água no tecido e no meio, e então, processadas conforme Jorge et al. (2004). Alíquotas de 25 μL do meio interno (tecido) e do meio externo (meio de incubação) foram transferidas para frascos contendo 3 mL de líquido de cintilação, utilizadas para a medida da radioatividade usando um contador de cintilografia líquida LKB-Rack Beta. Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade no tecido e no meio de incubação, avaliada pelo número de contagens por minuto (cpm), por mL do líquido tissular/ número de contagens por minuto por mL do líquido de incubação (T/M) ou em porcentagem do controle.

4.2.6 Análise morfológica

Após rápida remoção, o músculo foi fixado para microscopia óptica por imersão em Bouin. O músculo foi lavado várias vezes com álcool 70%, desidratado em soluções crescentes de álcool (96 a 99%) e clareado em clorofórmio. A obtenção de um bloco de parafina contendo o músculo procedeu-se pelos subseqüentes banhos de parafina $58 - 60^{\circ}$ (Merk) por 30 minutos. Efetuaram-se, então, cortes transversais seriados de 10 μm em micrótomo tipo Minot (Leitz). Após a montagem dos cortes em lâminas, estes foram secados em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Este material foi então utilizado para a realização das

técnicas de Hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico – Schiff (PAS) (ROMEIS, 1928; PEARSE, 1968).

4.3 DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a Média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificados nas figuras. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo na glicemia de ratos diabéticos (canferol triglicosilado)

O diabetes melito pode ser induzido em animais através de diferentes técnicas: destruição química ou remoção cirúrgica das células β do pâncreas, pancreactomia, uso de altas doses de hormônios contra-regulatórios, dietas ricas em açúcares e gorduras, entre outras. Para a indução do diabetes por destruição química as duas substâncias mais utilizadas são a estreptozotocina seguida da aloxana. A aloxana é uma substância que provoca a destruição específica das células β do pâncreas levando ao estado de deficiência de insulina através da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) que induzem a fragmentação do DNA, do distúrbio na homeostasia do cálcio intracelular e da inibição da glicocinase, enzima responsável pela secreção de insulina estimulada por glicose. Este fármaco pode produzir modelos de diabéticos moderados ou severos dependendo da dose que é administrada e dependendo também da espécie, linhagem, sexo, idade e estado nutricional dos animais (DUNN; LETCHIE, 1943; ISLAS-ANDRADE et al., 2000; SZKUDELSKI, 2001; VESSAL et al., 2003).

Jorge (2004) realizou um estudo que avaliou o efeito de diferentes doses de aloxana no perfil do diabético do tipo 1 através de parâmetros glicêmicos. Foram administradas pela via intravenosa as doses de 50, 60 ou 70 mg/kg de peso corporal. Com a dose de 50 mg/kg foi obtida uma glicemia na faixa de 350-480 mg/dL, com 60 mg/kg a glicemia ficou entre 490-580 mg/dL e com a dose de 70 mg/kg esses valores variaram entre 620-950 mg/dL. Apoiado nestes resultados optou-se por utilizar a dose de 50 mg/kg de peso para obtenção do diabetes experimental nos animais.

Os flavonóides e seus derivados são metabólitos secundários de plantas que são bastante explorados em função das inúmeras aplicações terapêuticas (HAVSTEEN, 1983; ONG; KHOO, 1996). Pizzolatti e colaboradores (2003) isolaram e caracterizaram cinco diferentes flavonóides nas folhas da espécie *Bauhinia forficata*. De Sousa et al. (2004)

demonstraram o efeito hipoglicemiante em animais normais e diabéticos do composto majoritário desta planta, o flavonóide glicosilado, canferitrina. Esse efeito foi verificado com as doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg. Da mesma forma, Cazarolli et al. (2006), estudaram o efeito de outro flavonóide isolado da *Bauhinia forficata*, o canferol (aglicona). Ao contrário da canferitrina, o canferol não demonstrou atividade hipoglicêmica com nenhuma das doses testadas (50 mg/kg e 100 mg/kg).

Dando continuidade ao estudo da atividade hipoglicemiante dos flavonóides obtidos da *Bauhinia forficata*, foi avaliado o possível efeito hipoglicemiante do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo nas doses de 50 mg/kg, 100 mg/kg e 200 mg/kg em animais diabéticos. A glicemia foi verificada nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após o tratamento pelas vias oral e intraperitoneal. A figura 15 demonstra que nenhuma das doses administradas pela via oral deste composto foi eficaz em reduzir significativamente a glicemia dos animais quando comparado com o tempo zero.

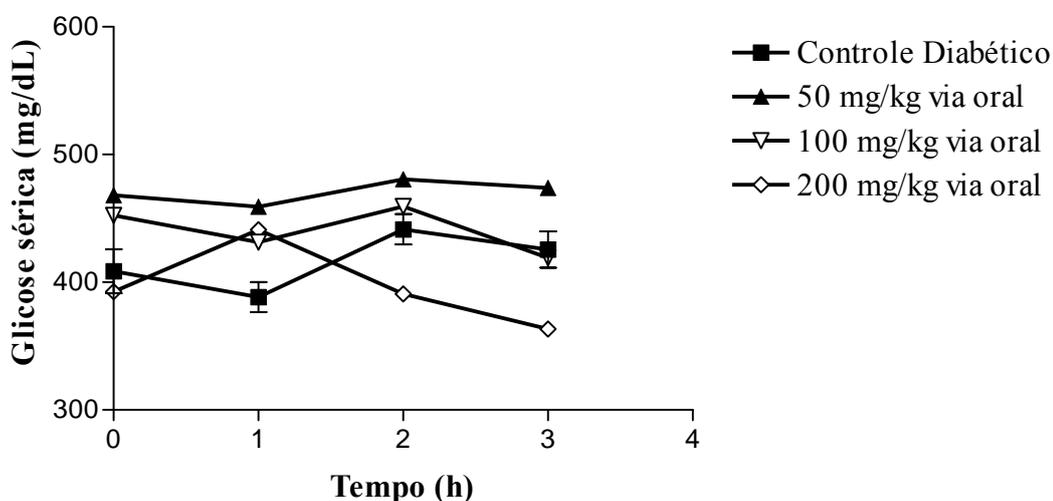


Figura 15. Efeito de diferentes doses do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo pela via oral na glicemia de ratos diabéticos. N = 6 para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Outros flavonóides com estruturas semelhantes ao canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo, como a canferitrina e o canferol-3-neohesperidosídeo, apresentaram atividade hipoglicemiante nestas mesmas doses, pela via

oral (CAZAROLLI, 2005). Confirmando assim, que a ausência de açúcar na molécula do flavonóide resulta na perda de sua atividade.

A atividade dos flavonóides e seus metabólitos depende da estrutura química e orientação das ligações na molécula (AHERNE; O'BRIEN, 2002). Muitos dos flavonóides ocorrem na forma glicosilada, sendo a glicose o açúcar mais comumente ligado à estrutura fenólica (HEIM et al., 2002). A glicosilação influencia as propriedades químicas, físicas e biológicas dos polifenóis, além de afetar a absorção dos mesmos pelas células intestinais (TAPIERO et al., 2002). Desta forma, foi avaliada a atividade do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosideo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo nas doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg também pela via intraperitoneal (Figura 16).

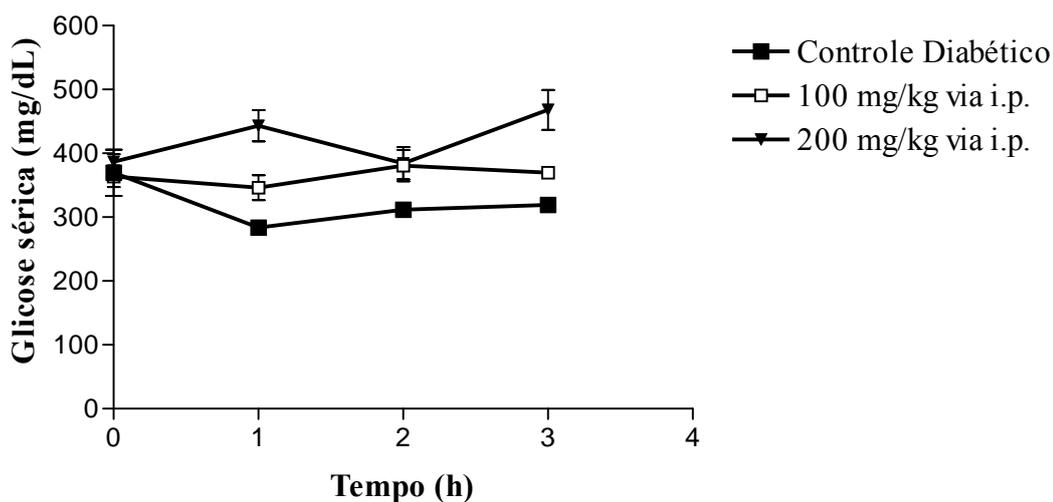


Figura 16. Efeito de diferentes doses do canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosideo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo pela via intraperitoneal (i.p.) na glicemia de ratos diabéticos. N = 6 para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Assim como o tratamento pela via oral com o canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosideo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo não foi efetivo em reduzir a glicemia de ratos diabéticos o tratamento pela via intraperitoneal também não se mostrou eficaz em nenhuma das doses e tempos estudados. Segundo Cazarolli (2005), um estudo de relação estrutura-atividade onde vários flavonóides (agliconas e glicosilados) tiveram o efeito hipoglicemiante avaliado, demonstrou que o tipo e a posição dos açúcares ligados à estrutura fenólica dos

flavonóides é de fundamental importância para a atividade hipoglicêmica dos mesmos. Alguns trabalhos mostraram a importância que os açúcares têm na absorção e metabolismo dos flavonóides, assim como nos efeitos fisiológicos e na hidro e lipofilicidade dos mesmos (SCALBERT et al., 2002; TAPIERO et al., 2002; MURATA; TERÃO, 2003). No caso deste flavonóide triglicosilado, isolado da *Bauhinia forficata*, a presença de um açúcar a mais ligado à molécula, comparando-se à estrutura da canferitrina e do canferol-3-neohesperidosídeo fez com que o flavonóide não apresentasse mais efeito.

Foi demonstrado em trabalhos anteriores que o flavonóide canferitrina, isolado das folhas da *Bauhinia forficata* possui um potencial efeito hipoglicêmico em ratos normais com a dose de 200 mg/kg após 1 h de tratamento e principalmente em animais diabéticos onde as doses de 50, 100 e 200 mg/kg apresentaram efeito após 1, 2 e 3 horas do tratamento (DE SOUSA et al., 2004). Esse mesmo composto quando administrado pela via intraperitoneal demonstrou efeito significativo de 1 a 6 horas após o tratamento com 100 mg/kg (CAZAROLLI et al., 2006). Semelhantemente, o flavonóide canferol-3-neohesperidosídeo isolado do caule da espécie *Cyathea phalerata* demonstrou um efeito hipoglicêmico em animais diabéticos com as doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg pela via oral e também pela via intraperitoneal com a dose de 100 mg/kg (CAZAROLLI et al., 2006).

A figura 17 compara o efeito de diferentes flavonóides isolados das espécies *Bauhinia forficata* (canferol, canferitrina, canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo) e *Cyathea phalerata* (canferol-3-neohesperidosídeo) administrados pela via oral na dose de 100 mg/kg na glicemia de ratos diabéticos.

Como se pode observar tanto o canferol-3-neohesperidosídeo quanto a canferitrina reduziram significativamente a glicemia de animais diabéticos neste período (2 horas após o tratamento) em 26% e 21%, respectivamente, quando comparados aos seus tempos zero. Os demais flavonóides, canferol 3-O-β-L-ramnopiranosil-β-D-glicopiranosídeo-7-O-α-L-ramnopiranosídeo não alteraram a glicemia.

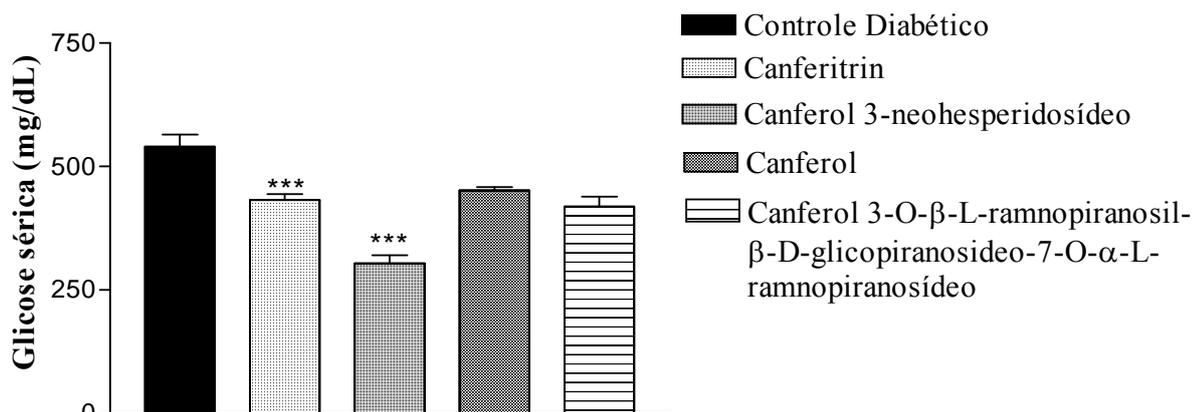


Figura 17. Efeito de diferentes flavonóides (100 mg/kg) administrados pela via oral na glicemia de ratos diabéticos. *** $P < 0,001$ comparado com o tempo 0 h (controle). $N = 6$ para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

É possível que a canferitrina e o canferol-3-neohesperidosídeo estejam exercendo estas ações na glicemia através da ativação do metabolismo da glicose em tecidos sensíveis à insulina, como o tecido muscular, uma vez que a aloxana causa destruição das células β do pâncreas. Jorge et al. (2004) demonstraram a ação insulino-mimética da canferitrina na captação de [^{14}C]DG no músculo. Este flavonóide estimulou a captação de glicose com as concentrações de 52 e 104 mM sem alterar a incorporação de ^{14}C -leucina em proteínas. Estes resultados levantaram a hipótese de que este composto deve atuar na velocidade de entrada da glicose (V_{max}) nas células e/ou na translocação dos carregadores de glicose para a membrana plasmática.

Uma vez verificado o efeito insulino-mimético da canferitrina na captação de glicose e pelo fato do canferol-3-neohesperidosídeo ter apresentado um efeito hipoglicêmico ainda melhor do que a canferitrina, principalmente quando complexado com o íon vanádio (IV) (CAZAROLLI et al., 2006), foi considerado de grande importância o estudo da ação do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose num tecido alvo da insulina, bem como, a influência no conteúdo de glicogênio.

5.2 Captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais

A captação de glicose no músculo esquelético é mediada pelo GLUT 4, a principal isoforma responsiva a hormônios como a insulina e às condições que demandam energia como o exercício ou em situação de hipóxia. A captação de glicose estimulada por insulina no músculo esquelético tem um papel importante na manutenção da homeostasia da glicose (WIJESEKARA et al., 2006).

Para os ensaios de captação de glicose no músculo, os animais foram eutanasiados, o músculo sóleo foi retirado e incubado no grupo controle (sem tratamento) e o músculo contralateral no grupo tratado (insulina ou canferol-3-neohesperidosídeo). A figura 18a mostra o músculo direito de animais normais e diabéticos e a figura 18b mostra uma microscopia óptica do músculo de animais normais.

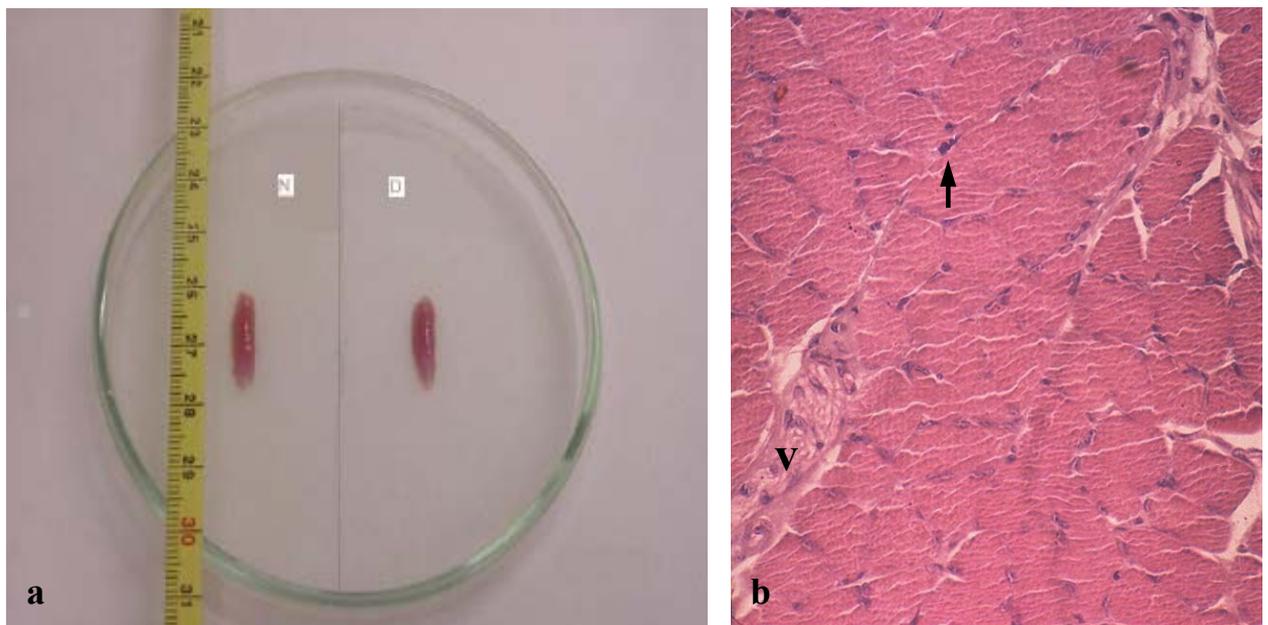


Figura 18. A) Músculo sóleo de ratos normais (N) e diabéticos (D) retirados da perna direita de cada animal. B) Microscopia óptica do músculo sóleo de rato normal. A seta indica o núcleo da fibra muscular. A letra “V” indica um vaso sanguíneo

Jorge et al. (2004) com o objetivo de estudar o efeito insulino-mimético da canferitrina realizaram uma curva de tempo (15, 30, 60 e 90 min) da captação basal da

[¹⁴C]DG no músculo sóleo de ratos normais. A deoxiglicose é um análogo sintético da glicose, a qual é transportada pelo mesmo mecanismo deste açúcar, mas é metabolizada somente a 2-deoxi-D-glicose-6-fosfato, permitindo assim medir somente o transporte da glicose (MIAN et al., 1979). Naquele estudo foi determinado que o melhor tempo de captação basal da [¹⁴C]DG era 60 minutos, embora esse efeito fosse observado de 30 até 90 minutos. O mesmo trabalho apresentou uma curva de dose-resposta da insulina (0,007; 0,07; 0,7; 3,5; 7,0; 35,0 e 70,0 nM) na captação da [¹⁴C]DG no músculo sóleo, a qual foi utilizada como base para os experimentos de captação com o canferol-3-neohesperidosídeo. O estímulo da insulina na captação foi dependente da dose e significativo com 3,5 e 7,0 nM após 1 hora de incubação.

5.2.1 Curva de dose-resposta do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais

Os flavonóides são um grupo de compostos fenólicos presentes em diversas plantas e que também fazem parte da dieta humana (TAPIERO et al., 2002). Muitas das atividades biológicas descritas para os flavonóides foram determinadas utilizando-se estudos *in vitro*. Com o objetivo de determinar o mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo na diminuição da glicemia foi inicialmente estudado o efeito na captação de [¹⁴C]DG. A figura 19 mostra o efeito de diferentes concentrações do canferol-3-neohesperidosídeo, *in vitro*, na captação de glicose no músculo sóleo no período de 1 h de incubação. Baixas concentrações deste composto (0,1 µM e 1,0 nM) mostraram um efeito estimulatório significativo de 21 e 35%, respectivamente, em relação à captação basal no período de 1 h. Quando foram utilizadas concentrações maiores deste flavonóide o efeito estimulatório não persistiu e deu lugar ao efeito inibitório, sendo significativo com as concentrações de 520; 1040; 1580 e 2080 µM. Estas concentrações representam uma inibição de 12%, 17%, 35% e 33%, respectivamente, na captação basal de glicose.

Comparando-se com o efeito estimulatório apresentado pela insulina (47%) na concentração de 1,0 UI (7,0 nM), semelhante ao efeito máximo na captação de glicose segundo trabalho de Jorge e colaboradores (2004), o canferol-3-neohesperidosídeo na concentração de 1,0 nM, em termos percentuais, foi tão efetivo quanto a insulina em estimular a captação de glicose no músculo. Com relação à potência, o canferol-3-neohesperidosídeo

também apresentou uma ação semelhante à do hormônio, uma vez que produziu um efeito estimulatório com uma concentração (1,0 nM) muito próxima àquela utilizada para demonstrar o efeito máximo (47%) da insulina (7,0 nM) neste modelo experimental.

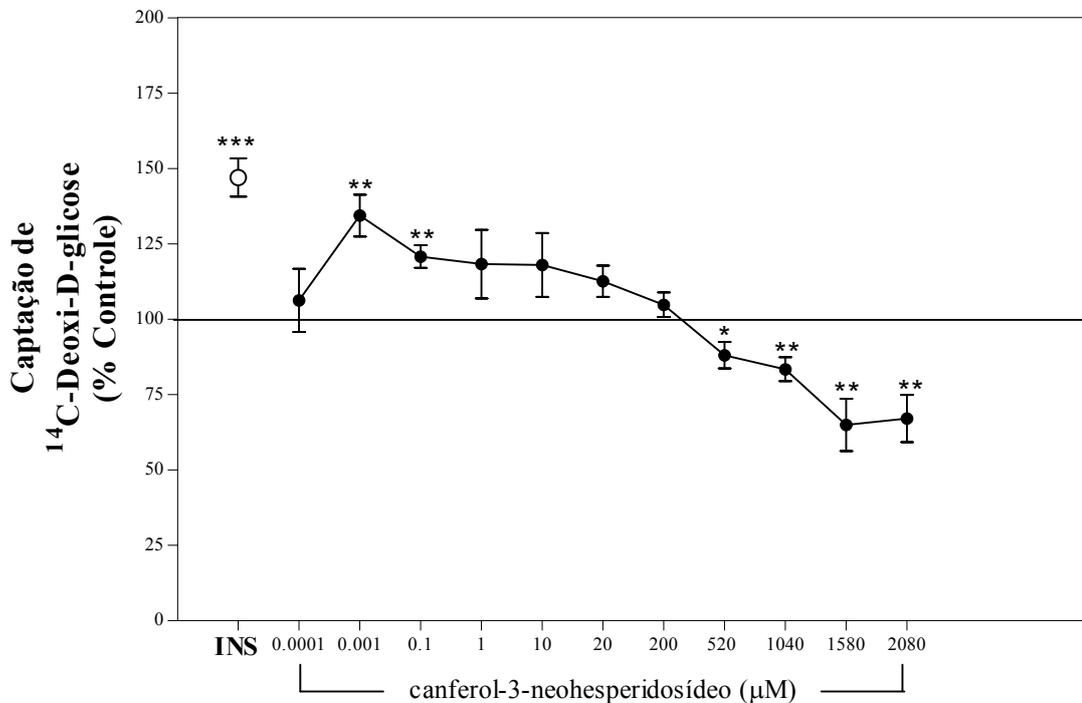


Figura 19. Efeito de diferentes concentrações do canferol-3-neohesperidosídeo (C-3N) e da insulina (INS) 1,0 UI (7 nM) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. *P < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 comparado com o controle. N = 6 para todos os grupos. Média ± S.E.M.

Considerando os efeitos do canferol-3-neohesperidosídeo observados por Cazarolli (2005) na redução da glicemia de ratos diabéticos, esses resultados da captação de glicose sugerem que o efeito hipoglicemiante observado *in vivo* possa ser decorrente do aumento da captação de glicose no músculo. Assim como observado nos experimentos *in vivo* em que uma dose maior (200 mg/kg) do flavonóide canferol-3-neohesperidosídeo não apresentou efeito na glicemia, nos experimentos *in vitro* quando foram utilizadas concentrações maiores do composto o efeito estimulatório na captação desapareceu dando lugar a um efeito inibitório.

Já foi demonstrado que diversos flavonóides exercem diferentes ações no metabolismo da glicose bem como dos lipídios. Flavonóides como a miricetina, canferitrina e puerarina são conhecidos por estimular a captação de glicose no tecido muscular, mecanismo esse, provavelmente responsável pelo efeito hipoglicemiante apresentado por estes flavonóides. A miricetina (1,0 mg/kg; i.v.) foi efetiva em atenuar o aumento da glicemia de animais diabéticos que foram submetidos a uma sobrecarga de glicose e nas concentrações de 0,01 a 10,0 μM estimulou, de maneira dependente da dose, a captação de glicose no músculo sóleo isolado de ratos diabéticos (LIU et al., 2005). A isoflavona puerarina além de demonstrar efeito anti-hiperglicêmico em ratos normais, diabéticos e hiperglicêmicos também estimulou a captação de glicose no músculo sóleo de animais diabéticos de uma maneira dependente da dose (de 0,01 a 100 μM) (HSU et al., 2003). Procianidinas obtidas da semente da uva apresentaram ação anti-hiperglicêmica e estimularam a captação de glicose em linhagens de células musculares (L6E9 miotubos) e adiposas (3T3-L1 adipócitos) (PINENT et al., 2004). Da mesma forma, Jorge et al. (2004) estudaram o efeito da canferitrina na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo de ratos normais. Este flavonóide que previamente havia demonstrado efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos, estimulou a captação basal de glicose em 43 e 46% com as concentrações de 52 e 104 μM , respectivamente. Quando se compara o efeito da canferitrina com o do canferol-3-neohesperidosídeo, em termos percentuais, a eficácia é semelhante, mas com relação à potência, o canferol-3-neohesperidosídeo mostrou uma potência muito maior (10^8 vezes) do que a canferitrina. Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos ensaios para determinação da ação hipoglicemiante destes flavonóides, onde o canferol-3-neohesperidosídeo, tanto na forma livre como complexada com o íon vanádio (IV), apresentou melhor efeito do que a canferitrina (CAZAROLLI et al., 2006).

Outros flavonóides são conhecidos por estimular a captação de glicose no tecido adiposo como é o caso da miricetina que além de estimular a captação no tecido muscular também aumentou o transporte de glicose no tecido adiposo através do aumento da velocidade de captação (V_{max}) e sem alterar o K_m (ONG; KHOO, 1996). O chá verde, um chá bastante consumido no oriente, rico em polifenóis, demonstrou um estímulo significativo na captação de glicose em adipócitos, sendo este estímulo atribuído ao flavonóide epigallocatequina galato (WU et al., 2004; ZAVERI, 2006).

Existem também aqueles flavonóides que atuam inibindo a captação de glicose basal, principalmente as agliconas (PARK, 1999). E a captação estimulada por insulina como é o caso da naringenina que inibiu a captação de [¹⁴C]DG em adipócitos 3T3-L1 com as concentrações de 25, 50 e 100 µM (HARMON; PATEL, 2003) e da catequina-galato, quercetina e miricetina que inibiram a captação de 2-metil-glicose estimulada por insulina em adipócitos isolados, com resultados indicando uma interação direta com o GLUT 4 (STROBEL et al., 2005). Outro flavonóide que atua sobre o GLUT 4 é a genisteína que inibe a captação estimulada por insulina em adipócitos 3T3-L1 com uma CI_{50%} de 20 µM de maneira independente da inibição da tirosina cinase (BAZUINE et al., 2005). Além disso, a genisteína apresenta efeito sobre o metabolismo lipídico do fígado e tecido adiposo afetando tanto a lipogênese como a lipólise e inibe a captação de glicose no tecido muscular estimulada pela proteína desacopladora 3 (UCP3) (HUPPERTZ et al., 2001; BHATHENA; VELÁSQUEZ, 2002).

Após ter sido verificado um significativo efeito hipoglicemiante do canferol-3-neohesperidosídeo, provavelmente por atuar na utilização de glicose pelos tecidos periféricos, como observado através do aumento na captação de glicose no músculo sóleo, estudou-se a influência deste flavonóide no conteúdo de glicogênio muscular em ratos normais, hiperglicêmicos e diabéticos.

5.3 Medida do conteúdo do glicogênio muscular

Os tecidos periféricos, principalmente o tecido muscular e adiposo, sofrem ação direta da insulina através do controle do transporte de glicose, pelo estímulo da translocação dos transportadores de glicose (MOORE et al., 2003). O aumento nos níveis de glicose sanguínea estimula a secreção de insulina a qual promove a captação de glicose nos tecidos e sua conversão a glicogênio (ROACH, 2002). O glicogênio é a principal forma de armazenamento intracelular de glicose e os depósitos estão presentes em vários tecidos, principalmente fígado e músculos (VATS et al., 2003). A insulina é o hormônio que controla a síntese do glicogênio aumentando a atividade da GS que é a enzima-chave deste processo. A insulina faz isso diminuindo a fosforilação da GS através da fosforilação de GSK-3 que inibe sua atividade (TAHA; KLIP, 1999; LIU, L. et al., 2006). As reservas de glicogênio são

importantes para manutenção da homeostasia da glicose do organismo e estão marcadamente reduzidas em pacientes diabéticos (JUNG et al., 2004). Sendo assim, foi estudada a influência que o flavonóide canferol-3-neohesperidosídeo apresenta sobre o conteúdo de glicogênio.

A figura 20 mostra que o conteúdo de glicogênio no músculo sóleo de ratos hiperglicêmicos tratados com insulina foi significativamente aumentado em relação ao grupo controle normal tanto no estado alimentado quanto no jejum. Nos animais diabéticos ocorreu uma significativa diminuição no conteúdo de glicogênio, mas que foi aumentada cerca de quatro vezes após 24 h da administração pela via oral do canferol-3-neohesperidosídeo (100 mg/kg). Estes resultados corroboram os resultados obtidos na captação de [¹⁴C]DG no músculo sóleo incubado com canferol-3-neohesperidosídeo, demonstrando o potencial efeito insulino-mimético deste flavonóide que promove o aumento na captação de glicose no músculo e esta provavelmente estaria servindo como substrato para a síntese do glicogênio muscular.

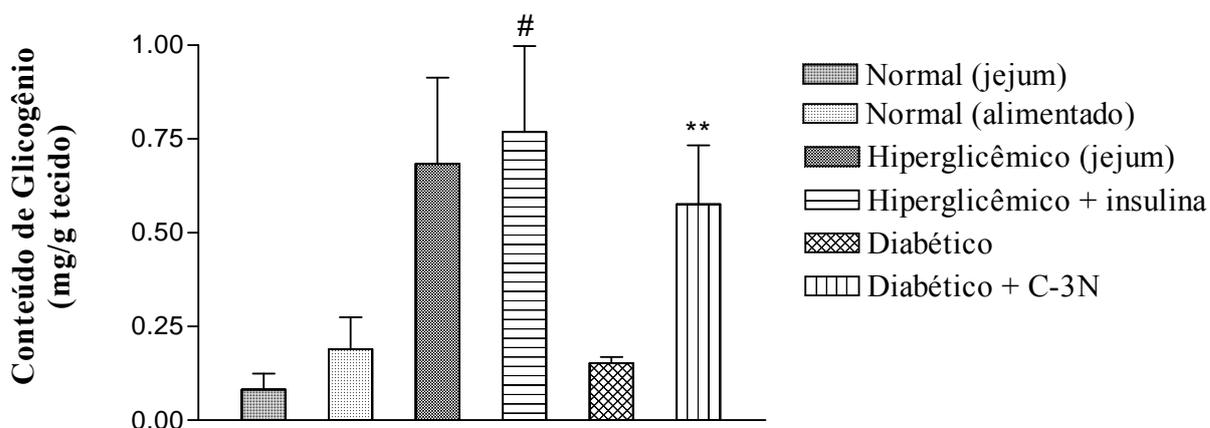


Figura 20. Conteúdo de glicogênio no músculo sóleo de ratos controles e ratos submetidos a diferentes tratamentos. ** $P \leq 0,01$ comparado com o controle normal (alimentado); normal (jejum) e diabético. # $P \leq 0,01$ comparado com o controle normal (alimentado) e normal (jejum). $N = 4$ para todos os grupos. Insulina = 0,5 UI; C-3N = 100 mg/kg (v.o.). Média \pm S.E.M.

Trabalhos têm mostrado a influência que alguns flavonóides exercem sobre o conteúdo de glicogênio, tanto hepático quanto muscular. O tratamento de ratos diabéticos por dois dias com miricetina (3 mg a cada 12h) além de reduzir a hiperglicemia em 50%,

aumentou o conteúdo de glicogênio e glicose-6-fosfato hepático, no entanto, não alterou o conteúdo de glicogênio muscular. Esse tratamento restaurou o conteúdo de glicogênio dos animais diabéticos em aproximadamente 37% e de glicose-6-fosfato em 36% sem apresentar efeitos em animais normais (ONG; KHOO, 2000). Da mesma forma, hesperidina e naringina demonstraram um efeito hipoglicêmico em um modelo de camundongo diabético que foi acompanhado do aumento das reservas de glicogênio hepático (JUNG et al., 2004). Um outro estudo utilizando a puerarina e a dadzeina demonstrou que o tratamento de camundongos obesos (C57BL-ob/ob) com a dadzeina pelas vias oral e intraperitoneal resultou no aumento da captação de [^{14}C]DG em muitos tecidos, com exceção do coração e músculo esquelético, e da incorporação no glicogênio (MEEZAN et al., 2005). Estudos prévios demonstraram que o tratamento de animais diabéticos com puerarina pela via intravenosa resultou numa diminuição da glicemia e aumento na captação, *in vitro*, de [^{14}C]DG no músculo sóleo destes animais diabéticos. Todos esses resultados reforçam a hipótese de que o canferol-3-neohesperidosídeo apresenta uma ação insulino-mimética onde o efeito hipoglicemiante seria decorrente do aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos, principalmente músculos, e a conseqüente utilização da glicose como substrato para síntese de glicogênio.

5.4 Estudo do mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais

Após observado o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose e no conteúdo de glicogênio no músculo, foi estudado o mecanismo de ação pelo qual este composto estimula a captação de [^{14}C]DG. Para tanto, foram utilizados inibidores de algumas proteínas cinases que estão envolvidas no processo de transdução de sinal da insulina, uma vez que os efeitos do flavonóide se assemelham aos da insulina.

A insulina aumenta o transporte de glicose no músculo através da translocação do GLUT 4 de sítios intracelulares para a superfície celular. Este processo é ativado através da ligação ao receptor presente na membrana de células alvo. Após a ligação, o receptor sofre autofosforilação resultando na ativação da cinase do receptor e conseqüente fosforilação de resíduos tirosina da família de substratos do receptor de insulina (IRS) os quais se ligam e ativam PI-3K que, por sua vez, ativa proteínas efetoras como PKB e PKC atípica. Uma destas proteínas ativadas pode estimular a translocação do GLUT 4 e conseqüentemente aumentar a

entrada de glicose na célula (TAHA; KLIP, 1999; SALTIEL; KAHN, 2001; LIU, L. et al., 2006). Apoiado nestas informações foram utilizados os inibidores da PI-3K, PKC, MEK e da síntese protéica para determinação do mecanismo de ação do canferol-3-neohesperidosídeo.

5.4.1 Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na ação da fosfatidilinositol-3 cinase (PI-3K)

A regulação dos níveis de glicose sanguínea é uma das mais importantes funções fisiológicas da insulina. O principal passo deste processo consiste na habilidade da insulina em estimular a translocação do GLUT 4 para a superfície celular e aumentar a captação de glicose no músculo e adipócitos. Para isso ela ativa diferentes proteínas cinases entre elas PI-3K, que catalisa a formação de PIP₃, um ativador alostérico de PDK. Alvos para PDK incluem PKB e isoformas atípicas de PKC, as quais quando ativadas fosforilam e estimulam a translocação do GLUT 4. Embora a contribuição de PKB e PKC para o transporte de glicose permanecem controversas, estudos demonstram a necessidade de PI-3K no processo de transporte de glicose estimulado por insulina (HARMON; PATEL, 2003). A produção de metabólitos lipídicos pela classe 1 de PI-3K é inibida por wortmannin (UI et al., 1995) e LY294002 (VLAHOS et al., 1994), bloqueando os efeitos biológicos da PI-3K na sinalização da insulina e conseqüentemente inibindo a captação de glicose.

Para determinar o mecanismo pelo qual o canferol-3-neohesperidosídeo aumenta a captação de glicose no músculo sóleo em condições livres de insulina, foi realizado um ensaio de captação utilizando 10 µM do LY294002, um inibidor específico da PI-3K (VLAHOS et al., 1994). A concentração de 10 µM foi escolhida em função de estudos prévios que resultaram na inibição da captação de glicose no músculo (SHEPHERD et al., 1997; NISHITANI et al., 2002).

Para testar o efeito inibitório do LY294002 na captação de glicose nas condições experimentais até então aplicadas, foi utilizado como um controle positivo desta ação estimulatória na captação, a insulina. A figura 21 mostra o efeito de 10 µM do inibidor LY294002 na captação de [¹⁴C]DG basal e estimulada por insulina (1,0 UI) após 1 h de incubação. Os resultados mostraram que a concentração de 10 µM de LY294002 nestas

condições estudadas inibiu 90% da captação estimulada por insulina e não alterou a captação basal de glicose conforme demonstrado em outros trabalhos (SHEPHERD et al., 1997; HUTCHINSON; BENGTSSON, 2005).

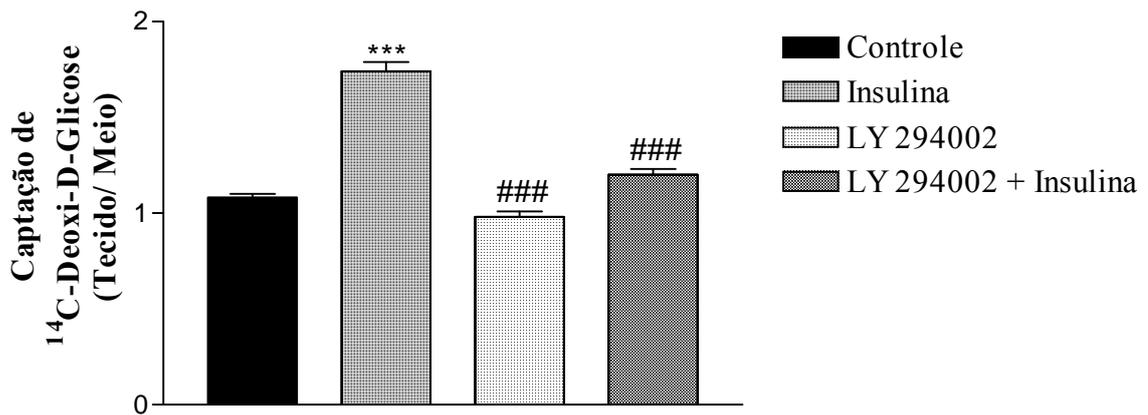


Figura 21. Efeito da insulina 1,0 UI (7 nM) e do inibidor da PI-3K (LY294002; 10 μ M) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. ***P < 0,001 comparado com o controle, ###p < 0,001 comparado à insulina. N = 6 para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

A figura 22 mostra que o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose foi completamente inibido após prévia incubação dos músculos com o inibidor da PI-3K (LY294002). Quando LY294002 foi adicionado na amostra controle nenhuma alteração na captação basal de glicose foi observada. Através deste resultado, pode-se concluir que o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose no músculo é dependente da ativação de PI-3K.

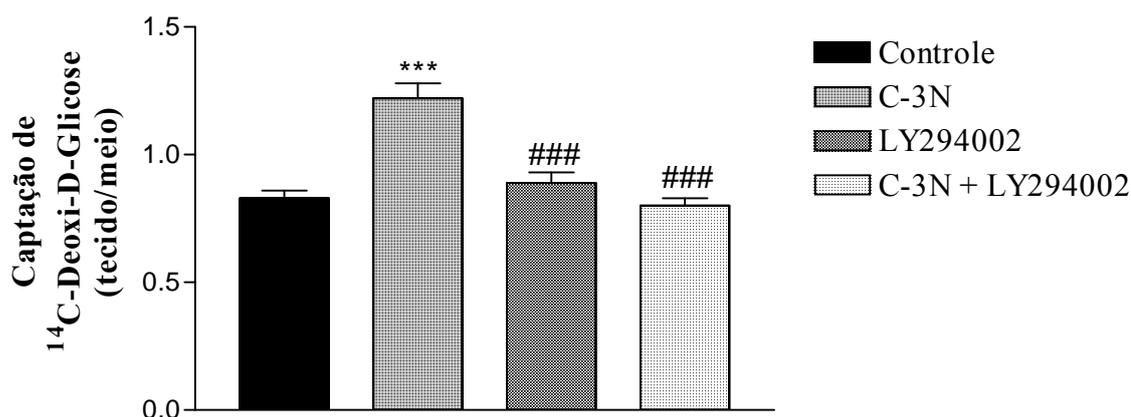


Figura 22. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo (C-3N; 1 nM) e do inibidor da PI-3K (LY294002; 10 μ M) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. *** $P < 0,001$ comparado com o controle, ### $p < 0,001$ comparado ao canferol 3-neohesperidosídeo. $N = 6$ para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Outros flavonóides já mostraram efeitos, tanto estimulatórios quanto inibitórios, sobre a ação de PI-3K. Como relatado anteriormente, procianidinas isoladas de sementes de uvas demonstraram um efeito estimulatório na captação de glicose em linhagens de células musculares e adiposas e este efeito requer a atividade da PI-3K (PINENT et al., 2004). A epigallocatequina galato, um constituinte do chá verde, mostrou efeito hipoglicemiante em animais. Além disso, inibiu a produção de glicose hepática através da diminuição da expressão de genes que controlam a gliconeogênese como das enzimas PEPCK e glicose-6-fosfatase, sendo este processo dependente da PI-3K, ou seja, epigallocatequina galato exerce efeito inibitório sobre a gliconeogênese ativando PI-3K (WALTNER-LAW et al., 2002). A fração enriquecida em homoisoflavonas da espécie *Liriope platyphylla* Wang et Tang aumentou a captação de glicose estimulada por insulina, e este estímulo envolveu o aumento do conteúdo de GLUT 4 na membrana via aumento da ligação de IRS1 e da subunidade regulatória p38 da PI-3K (CHOI et al., 2004).

O flavonóide naringenina é conhecido por bloquear a atividade da PI-3K em adipócitos e assim inibir a captação de glicose (HARMON; PATEL, 2003). Outros 14 flavonóides foram investigados com possível ação inibitória sobre PI-3K, dentre eles, a quercetina, luteolina, miricetina, apigenina e diosmetina demonstraram algum tipo de inibição sobre a atividade da PI-3K (AGULLO et al., 1997).

Os resultados do presente trabalho evidenciam a participação ativa da PI-3K no processo estimulatório do transporte de glicose promovido pelo canferol-3-neohesperidosídeo. No entanto, para que se confirme o modo pelo qual este flavonóide atua sobre PI-3K são necessários estudos adicionais que demonstrem a expressão e grau de fosforilação desta enzima.

5.4.2 Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na ação da PKC

Diversas isoformas (α , β II, δ e ζ) de PKCs são ativadas por insulina em diversos tipos de células. Foi demonstrado que essas isoformas podem mimetizar ou modificar os efeitos estimulatórios da insulina em um ou todos os tecidos sensíveis a esse hormônio (SAMPSON; COOPER, 2006).

Considerando que o canferol-3-neohesperidosídeo exerce um efeito estimulatório na captação de glicose via PI-3K e sendo a PKB e as isoformas atípicas da PKC (ζ e λ) as proteínas alvo conhecidas desta enzima (TAHA; KLIP, 1999; SALTIEL; KAHN, 2001), foi estudado se o efeito do canferol-3-neohesperidosídeo envolvia a ativação de algumas destas proteínas alvo de PI-3K. Para tanto, foi utilizado o RO318220 como inibidor de PKC.

Tanto a ativação de PKC ζ quanto PKC λ por insulina é dependente de PI-3K (KAHN; PESSIN, 2002). Estas isoformas de PKC são importantes no estímulo do transporte de glicose (STANDAERT et al., 1999). Estudos recentes sugeriram que PKC ζ além de fosforilar VAMP2 e promover a translocação do GLUT 4 (BRAIMAN et al., 2001) também interage com proteínas envolvidas na fusão do GLUT 4 com a membrana plasmática como o substrato 80K-H, munc 18c, V-SNARE e t-SNAREs (BRAIMAN et al., 2001; KAHN et al., 2001; HODGKINSON et al., 2005) e estava associada ao remodelamento da actina (LIU, L. et al., 2006).

Para determinar se o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose no músculo envolvia a ativação da PKC, foi utilizado como inibidor o RO318220 (DAVIS et al., 1989; DAVIES et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2004). Embora os trabalhos demonstrem que a $CI_{50\%}$ do RO318220 seja 10 nM, em tecidos intactos como é o caso do músculo sóleo, são utilizadas concentrações maiores deste inibidor (AVIGNON et al.,

1996). Altas concentrações do mesmo (40 μ M) produzem uma diminuição significativa na captação de glicose estimulada por insulina no músculo sóleo (RODRIGUEZ et al., 2004). Estes resultados sugerem que o uso de uma alta concentração do inibidor produz uma inibição completa de todas as isoformas de PKC (as quais variam em sensibilidade sendo α , β \gg δ , ϵ \gg ζ) (AVIGNON et al., 1996).

A figura 23 mostra que quando o RO318220 (40 μ M) foi utilizado durante a pré e incubação do tecido não se observou mais o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo no transporte de glicose. A captação na presença de ambos, canferol-3-neohesperidosídeo e RO318220, foi similar à captação basal (inibição de 75% do estímulo). Estes resultados indicam que a ativação da PKC é necessária para o efeito estimulatório pleno deste flavonóide na captação de glicose no músculo.

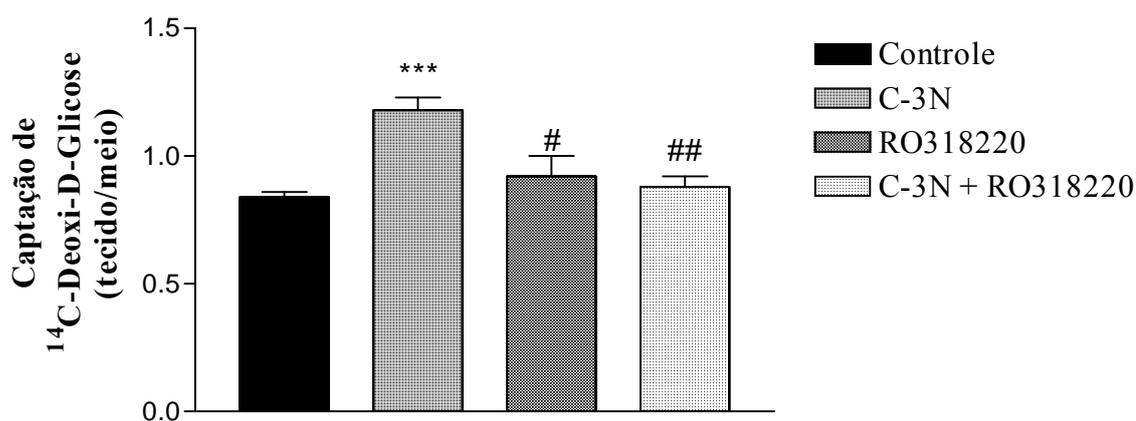


Figura 23. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo (C-3N; 1 nM) e do inibidor da PKC (RO318220; 40 μ M) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. ***P < 0,001 comparado com o controle, #p < 0,05 e ##p < 0,01 comparado ao canferol 3-neohesperidosídeo. N = 6 para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Estes resultados revelam o envolvimento da PKC na ação estimulatória do canferol-3-neohesperidosídeo e evidenciam ainda mais a ligação desta proteína cinase na captação de glicose com o recrutamento de transportadores para a membrana, de acordo com o demonstrado por LIU, L. et al (2006) e LIU, X. et al. (2006) que estudaram os efeitos da insulina na captação de glicose envolvendo a PKC.

Também, de acordo com os resultados do presente trabalho, estudos prévios evidenciaram o envolvimento de PKC na ação estimulatória de compostos como o aminoácido leucina, as sulfoniluréias e o flavonóide puerarina na captação de glicose. A leucina estimulou a captação de glicose no músculo sóleo via ativação de PI-3K e PKC (NISHITANI et al., 2002). O flavonóide puerarina também estimulou a captação de glicose via ativação de α 1-adrenoreceptores e este estímulo envolveu a ativação de PKC (HSU et al., 2002).

5.4.3 Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na via de MAPK

A insulina estimula a atividade da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) via proteína cinase cinase ativada por mitógeno (MEK). A ativação desta via leva à proliferação e diferenciação celular mas não afeta as ações metabólicas da insulina (LAZAR et al., 1995; SALTIEL; KAHN, 2001). Dos quatro principais subgrupos de MAPK, ERK parece ser a principal cinase envolvida no crescimento e diferenciação celular. JNK está envolvida na resistência à insulina e p38 MAPK está relacionada com a regulação do transporte de glicose no músculo esquelético. Estes resultados são ainda controversos, uma vez que alguns trabalhos relatam que p38 MAPK é necessária para os efeitos da insulina no transporte de glicose enquanto outros sugerem que p38 MAPK é um regulador negativo da captação de glicose estimulada por insulina (HO et al., 2004).

Diversos investigadores relataram a existência de interação na transdução de sinais intracelulares entre a via de PI-3K e MAPK. Foi descrito que a inibição de PI-3K impede a ativação completa de p44/p42 MAPK em diversos tipos de células, entre elas, os 3T3-L1 adipócitos e células humanas de hepatoma (SUGA et al., 1997; LIN; CHOU, 1998; HARMON et al., 2004). A via da MAPK pode interagir com a via de PI-3K através de Ras, contudo, ainda não está claro se PI-3K atua sobre proteínas que ativam ou que são ativadas por Ras (TAHA; KLIP, 1999).

Para estudar se o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose envolve a via de MAPK e conseqüente regulação na expressão dos transportadores de glicose foi utilizado PD98059, um inibidor de MEK. O uso de 50 μ M do inibidor foi em

função de alguns trabalhos relatarem que nesta concentração ocorre uma completa inibição de MEK (DAVIES et al., 2000; HARMON et al., 2004).

Na figura 24 observa-se que a captação de [^{14}C]DG basal e estimulada por canferol-3-neohesperidosídeo não foi alterada com o uso de 50 μM de PD98059.

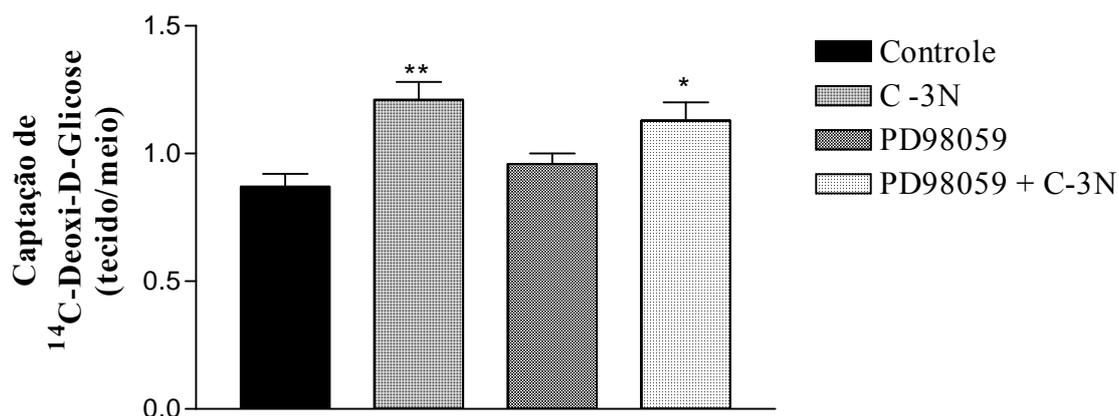


Figura 24. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo (C-3N; 1 nM) e do inibidor da MEK (PD98059; 50 μM) na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. * $P < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o controle. $N = 6$ para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Estes resultados demonstram que o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose não envolve diretamente a ativação de MAPK e sugerem que este composto possa estar atuando aumentando a velocidade de translocação dos transportadores para a membrana celular, já que não houve uma redução significativa no efeito estimulatório deste flavonóide na presença de PD98059. Este resultado está de acordo com Lazar et al. (1995) que demonstraram que a ativação de MAPK não é requerida para a captação de glicose, síntese de glicogênio e lipogênese estimulada por insulina. Hutchinson e Bengtsson (2005) utilizando a linhagem de células musculares L6 também observaram que a captação de glicose estimulada por insulina não é afetada com o uso de PD98059 (10 μM), assim como Wojtaszewski e colaboradores (1999) não verificaram esse efeito no músculo com 50 μM de PD98059. No entanto, Harmon e colaboradores (2004) utilizando o mesmo inibidor (50 μM) demonstraram uma inibição de aproximadamente 33% na captação de

glicose estimulada por insulina em adipócitos, mas este processo não envolveu o aumento na translocação e exocitose do GLUT 4 na membrana. Da mesma forma, a via de ERK é cogitada como um possível mediador que leva ao aumento da captação de glicose do músculo durante o exercício (CHEN et al., 2002).

O que se observa é uma discordância nos resultados em relação ao efeito do PD98059 na captação de glicose. É possível que isto ocorra em virtude do uso de diferentes concentrações do inibidor, concentrações estas que podem não inibir completamente os efeitos de MEK ou inibir outras proteínas cinases além de MEK. Além disso, o uso de diferentes tecidos e células pode resultar na obtenção de diferentes respostas para o mesmo estímulo.

Embora estes resultados do presente trabalho demonstrem que a ação do canferol-3-neohesperidosídeo não é alterada com o uso do inibidor PD98059, não pode ser descartado, completamente, o envolvimento da via MAPK nesta ação, uma vez que p38 MAPK é descrita como um mediador das ações da insulina na captação de glicose. Para determinarmos o envolvimento desta via nas ações do canferol-3-neohesperidosídeo é necessário o uso de um inibidor específico para esta proteína. Ou ainda, pode haver o envolvimento de MAPK em outras ações deste flavonóide como mudanças nos níveis de RNAm e de proteínas, uma vez que ERK é conhecida por afetar a transcrição gênica.

5.4.4 Efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose com a síntese protéica bloqueada

A insulina estimula a captação de glicose em adipócitos e no músculo esquelético primeiramente via redistribuição ou recrutamento de transportadores para membrana plasmática, além de aumentar a atividade intrínseca destes transportadores. Ao contrário da rápida resposta, o tratamento crônico com insulina estimula o transporte de glicose regulando a síntese de novos transportadores (WALKER et al., 1990).

Neste trabalho, a cicloheximida, um potente inibidor da síntese de proteínas, foi empregada para avaliar se o efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de glicose envolve a síntese de novos transportadores. A concentração de 0,35 mM utilizada foi baseada

em outros trabalhos deste grupo (ZAMONER et al., 2005; MENEGAZ et al., 2006) que demonstraram a inibição completa da síntese de proteínas gerais por este inibidor.

A figura 25 mostra que a captação de [^{14}C]DG estimulada por canferol-3-neohesperidosídeo não foi modificada com a síntese protéica previamente inibida. Da mesma forma, quando o músculo foi incubado apenas com cicloheximida não houve alteração significativa na captação basal de [^{14}C]DG.

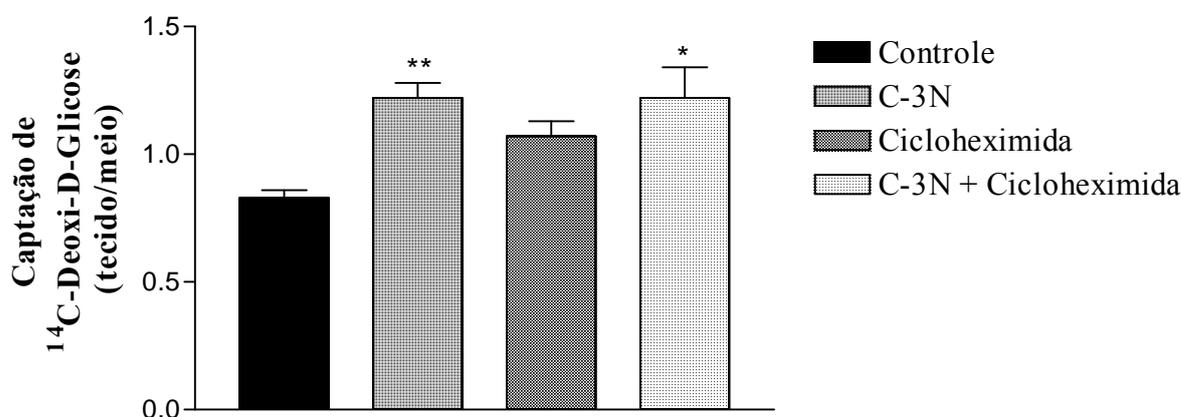


Figura 25. Efeito do canferol-3 neohesperidosídeo (C-3N; 1 nM) e da cicloheximida (0,35 mM) na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. * $P < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado com o controle. $N = 6$ para todos os grupos. Média \pm S.E.M.

Existem relatos na literatura mostrando que a incubação de adipócitos com cicloheximida reduz grandemente o número de carreadores de hexose na membrana plasmática de células estimuladas com insulina, no entanto, a insulina é ainda capaz de estimular a captação de glicose, sugerindo uma dissociação entre os eventos de estímulo no transporte de glicose e recrutamento de transportadores (BALY; HORUK, 1987; MATTHAEI et al., 1988). Estes resultados são controversos, uma vez que outros grupos demonstraram que a cicloheximida não afeta nem o transporte de glicose e nem a translocação dos transportadores estimulado por insulina (KONO et al., 1981; JONES; CUSHMAN, 1989). O que se pode concluir destes trabalhos é que a inibição da síntese de proteínas por cicloheximida não interfere no estímulo agudo da insulina (1 h) no transporte de glicose. No entanto, este inibidor inibe completamente o transporte de glicose estimulado por insulina após tratamento crônico (24 h) (YOUNG et al., 1986; JONES; CUSHMAN, 1989).

Jorge et al. (2004) demonstraram que o tratamento de ratos normais e diabéticos com um flavonóide que apresenta ação hipoglicemiante, a canferitrina, não causou nenhuma alteração na incorporação de ^{14}C -Leucina em proteínas no músculo daqueles animais após 2 h do tratamento. Ao contrário do que foi observado com a canferitrina e canferol-3-neohesperidosídeo, outros trabalhos decreveram que a ação estimulatória de algumas substâncias na captação de glicose, entre elas, compostos fenólicos isolados de plantas é dependente da síntese de novos transportadores. A cicloheximida incubada durante 16 h juntamente com um dos extratos, ricos em polifenóis, de *Canna indica* inibiu quase que completamente a captação de glicose estimulada por estes extratos em cultura de células musculares (PURINTRAPIBAN et al., 2006). Também houve um bloqueio completo do estímulo na captação de glicose produzido pelo extrato metanólico das espécies *Aegles marmelos* e *Syzygium cumini* após 24h de incubação de L6 miotubos com ambos, inibidor e extrato (ANANDHARAJAN et al., 2006).

Os resultados com o canferol-3-neohesperidosídeo sugerem que a ação aguda na captação de glicose não depende da tradução do RNAm em transportadores de glicose. Contudo, não se pode inferir que o número de transportadores de glicose não seja alterado com o tratamento com cicloheximida, nem que o canferol-3-neohesperidosídeo não apresente efeitos sobre a síntese de novos transportadores num tratamento mais longo. Para se determinar isso seriam necessários estudos adicionais de captação num período maior de incubação além da determinação do número de transportadores presentes na membrana e nas vesículas de estoques internos, tratados ou não com o flavonóide.

5.4.5 Estudo do efeito do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose estimulada por insulina

A captação de glicose no músculo esquelético pode ser estimulada tanto por insulina quanto por uma “via alternativa” que envolve o exercício/contração muscular (ativando AMPK e liberando Ca^{2+}) (WIJESEKARA et al., 2006). Para determinar se o canferol-3-neohesperidosídeo possui um efeito aditivo ou sensitizador da insulina na captação de ^{14}C DG, os músculos foram pré-incubados e posteriormente incubados com o flavonóide e a insulina juntos.

Os resultados demonstram que o canferol-3-neohesperidosídeo não potencia os efeitos da insulina uma vez que não se observou a soma dos efeitos do hormônio e do flavonóide, quando incubados juntos, na captação de glicose (Figura 26). Isso é mais um indicativo de que o canferol-3-neohesperidosídeo atua, possivelmente, na mesma via de sinalização da insulina.

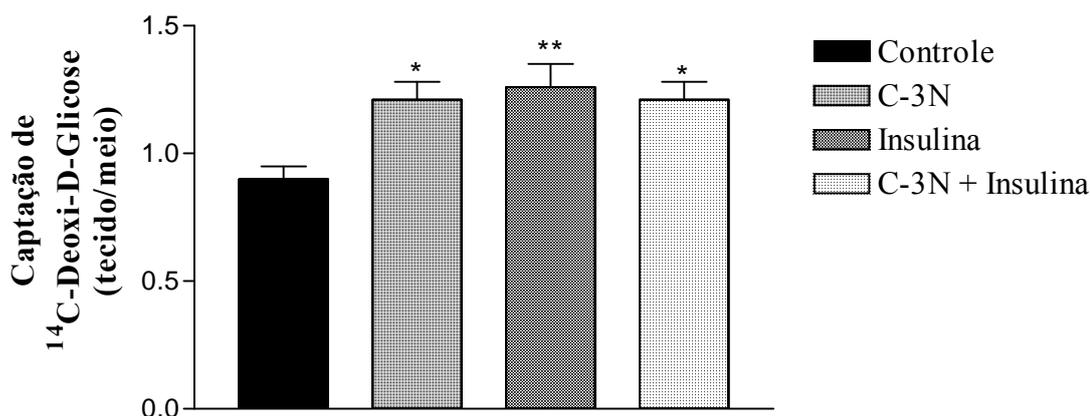


Figura 26. Efeito da combinação do canferol-3-neohesperidosídeo (C-3N; 1,0 nM) e da insulina (1,0 UI = 7 nM) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. *P < 0,05; **p < 0,01 comparado com o controle. N = 6 para todos os grupos. Média ± S.E.M.

Outros trabalhos têm demonstrado que algumas substâncias com efeito estimulatório na captação de glicose atuam pela mesma via da insulina como é o caso do bis-peroxivanádio-1,10-fenantroleno (bpV(phen)) que foi tão potente quanto a insulina e a contração muscular juntas no estímulo da captação de glicose. No entanto, quando incubado juntamente com a insulina o efeito não foi potencializado (NOLTE et al., 2003). Procianidinas, isoladas das sementes das uvas, demonstraram um efeito adicional ao da insulina numa baixa concentração na captação de glicose em adipócitos 3T3-L1, mas quando foram incubadas juntamente com uma dose supra máxima de insulina este efeito aditivo não foi mais observado em células musculares, e nos adipócitos este efeito não foi maior do que a soma dos efeitos independentes (PINENT et al., 2004). Outras substâncias têm demonstrado atuação por uma via diferente daquela estimulada por insulina como é o caso dos medicamentos rosiglitazona e

metformina que estimulam a captação de glicose via ativação de AMPK (ZHOU et al., 2001; FRYER et al., 2002).

Este resultado nos permite inferir que o canferol-3-neohesperidosídeo estimula a captação de glicose no músculo ativando proteínas cinases que fazem parte do processo de sinalização da insulina com conseqüente aumento da translocação do GLUT 4 e que muito provavelmente este não exerça a ação estimulatória no transporte de glicose ativando outra via como, por exemplo, a da AMPK ou do cálcio.

5.5 Estudo do efeito de outros flavonóides na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais

5.5.1 Curva de dose-resposta da quercetina na captação de ^{14}C -Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos

A quercetina é um flavonóide, relativamente abundante, encontrado em altas concentrações no chá verde, em maçãs e cebolas e que também está presente nas folhas da *Bauhinia forficata* Link. Este flavonóide é conhecido por inibir a captação de glicose estimulada por insulina em adipócitos e estes efeitos parecem ser decorrentes da ação sobre as funções do receptor de insulina, PI-3K e transportadores de glicose (GLUTs) (SHISHEVA; SCHETER, 1992; AGULLO et al., 1997; WALKER et al., 2000; STROBEL et al., 2005). Existem diversos trabalhos, que usaram cultura de células ou células isoladas do tecido adiposo, demonstrando que a quercetina inibe as ações da insulina no metabolismo da glicose como, por exemplo, o transporte de glicose e a incorporação em lipídios. No entanto, não foi encontrado nenhum relato da ação da quercetina na captação de glicose, basal ou estimulada por insulina, no músculo. Por isso, estudamos o efeito deste flavonóide, um dos componentes da fração *n*-butanólica isolado das folhas da *Bauhinia forficata*, na captação de glicose no músculo sóleo.

A figura 27 mostra o efeito da quercetina no músculo sóleo de ratos normais quando incubado com esse composto por 1h. A quercetina na concentração de 0,1 mM estimulou significativamente a captação de glicose em aproximadamente 43%, contrariando trabalhos

que dizem que a quercetina nesta concentração não altera a captação basal de glicose em adipócitos (SHISHEVA; SCHETER, 1992; STROBEL et al., 2005).

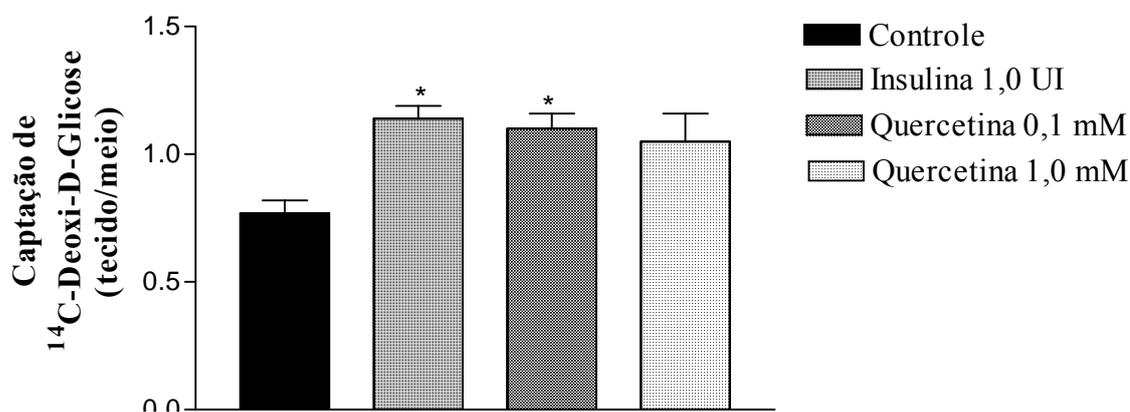


Figura 27. Efeito da quercetina (aglicona) 0,1 e 1,0 mM na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. *P < 0,05 comparado com o controle. N = 6 para todos os grupos. Média ± S.E.M.

O efeito estimulatório, apresentado pela quercetina, no transporte de glicose pode ser decorrente da ligação ao transportador de glicose (GLUT) presente na membrana da célula. Existem estudos mostrando a interação deste flavonóide com o GLUT num sítio denominado QLS, mesmo sítio de interação da D-glicose (STROBEL et al., 2005; CUNNINGHAM et al., 2006). Esta interação poderia aumentar a atividade do transportador e conseqüentemente a entrada de glicose na célula, de uma maneira diferente da estimulada por insulina.

Alguns autores demonstraram ainda que a quercetina exerce diversos efeitos no metabolismo da glicose quando administrada pela via oral em animais diabéticos num tratamento subcrônico. Efeitos como a diminuição dos níveis glicêmicos, aumento da atividade da hexocinase e glicocinase hepáticas e normalização da curva de tolerância à glicose além do aumento do número de ilhotas pancreáticas. Os autores atribuíram esses efeitos ao potencial anti-oxidante que a quercetina possui e como conseqüência disso ela estaria regenerando as células pancreáticas e aumentando a secreção de insulina, portanto, essas ações no metabolismo da glicose seriam decorrentes do aumento da secreção de insulina (VESSAL et al., 2003).

Park (1999) quando avaliou o efeito de diferentes flavonóides na captação basal de glicose em células U937 observou que a quercetina na concentração de 0,1 mM inibe o transporte de glicose em aproximadamente 80%. Martin e colaboradores (2003) também demonstraram que a quercetina inibe o transporte de glicose em eritrócitos humanos, e que este efeito depende do pH do meio. No trabalho de Cermak e colaboradores (2004) foi observado o efeito inibitório na captação de glicose em vesículas do jejuno de porcos, mas com as formas glicosiladas da quercetina (quercetina-3-*O*-glicosídeo e quercetina-4-*O*-glicosídeo) na concentração de 0,6 mM. Quando foi avaliado o efeito da quercetina aglicona, na mesma concentração, no transporte de glicose através desta membrana o efeito inibitório não foi verificado, da mesma forma que não observamos no músculo. Esta divergência entre os resultados pode ser decorrente das diferentes condições experimentais bem como das respostas que diferentes tipos e formas de tecidos podem apresentar (tecido inteiro, parte de tecido, célula isolada, cultura de célula). São necessários mais estudos para determinar o mecanismo pelo qual a quercetina na concentração de 0,1 mM estimula a captação de glicose no músculo.

A figura 28 mostra a ação da quercetina na captação de glicose estimulada por insulina (1,0 UI) no músculo sóleo de ratos normais. A quercetina na concentração de 0,1 mM que anteriormente foi demonstrado ter ação estimulatória na captação de glicose, quando incubada juntamente com a insulina não alterou o efeito estimulatório deste hormônio; não inibiu, nem potencializou sua ação. Contudo, a concentração de 1,0 mM demonstrou um leve efeito inibitório (34%) da ação da insulina no transporte e glicose, mas que não foi significativo.

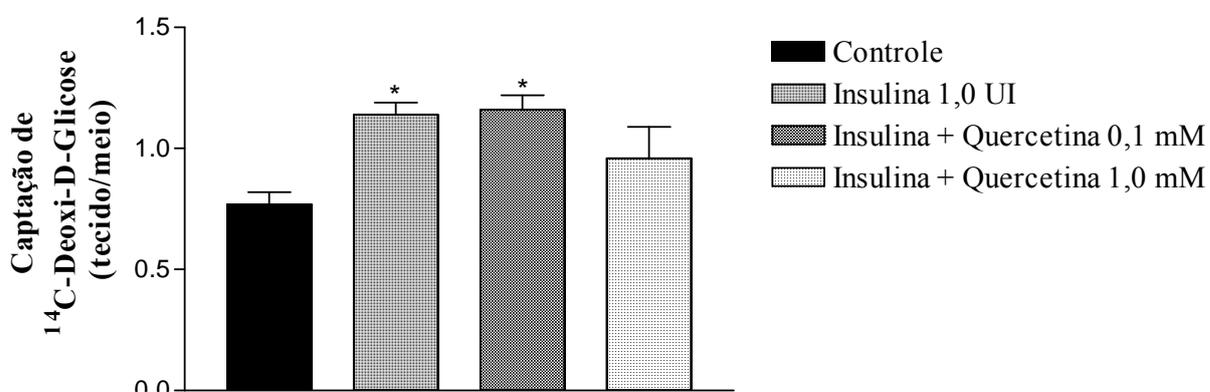


Figura 28. Efeito da quercetina (aglicona) 0,1 e 1,0 mM na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose estimulada por insulina (1,0 UI = 7 nM) no músculo sóleo de ratos normais. *P < 0,05 comparado com o controle. N = 6 para todos os grupos. Média ± S.E.M.

Novamente estes resultados são contrários aos demonstrados nos estudos em células adiposas onde foi comprovado o efeito inibitório da quercetina na captação de glicose estimulada por insulina (SHISHEVA; SCHETER, 1992; STROBEL et al., 2005). Este pequeno efeito inibitório, porém, não significativo, demonstrado pela quercetina pode ser decorrente da competição com a glicose pela ligação no GLUT 4, uma vez que foi demonstrado que este flavonóide inibe o transporte de glicose via GLUT 1,-2, -3, -4 (PARK; LEVINE, 2000; SONG et al., 2002; NAFTALIN et al., 2003; STROBEL et al., 2005). Outro fator que deve ser levado em consideração é que a quercetina em concentrações superiores a 0,1 mM pode levar à morte celular (SHIH et al., 2004).

5.5.2 Efeito do canferol (aglicona) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos

A figura 29 mostra o efeito do canferol na captação de glicose no músculo sóleo de animais normais. Como esperado, este flavonóide não exibiu nenhuma ação no transporte de glicose no músculo, uma vez que ele também não foi eficaz em diminuir os níveis de glicose sanguínea quando administrado pela via oral em animais diabéticos (CAZAROLLI, 2005). Também foi utilizado um controle do veículo (DMSO), uma vez que só foi possível a solubilização completa do canferol numa concentração relativamente alta de DMSO (10%). Esta concentração segundo Da Violante e colaboradores (2002) não produz nenhum dano celular significativo em células Caco2/TC7 e neste trabalho foi comprovado que 10% DMSO não altera o transporte de glicose no músculo.

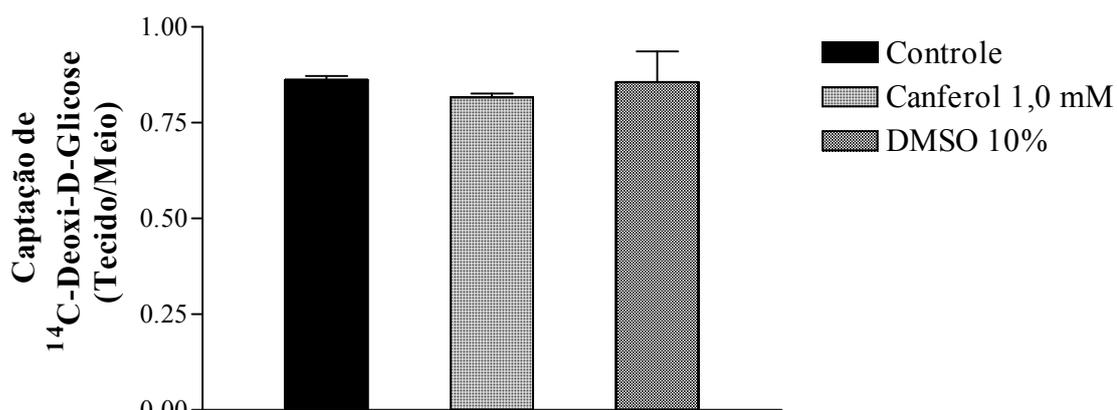


Figura 29. Efeito do canferol (1,0 mM) e de DMSO (10%) na captação de ¹⁴C-Deoxi-D-Glicose no músculo sóleo de ratos normais. *P < 0,05 comparado com o controle. N = 6 para todos os grupos. Média ± S.E.M.

Existem trabalhos mostrando que o canferol inibe o transporte de glicose em eritrócitos humanos além de ser inibidor de proteínas tirosina cinase, como o receptor EGF, e a PKC, mas não de PI-3K (AKIYAMA et al., 1987; AGULLO et al., 1997; MARTIN et al., 2003). Contudo, até agora, nenhum trabalho demonstrou o efeito estimulatório na captação de glicose para esta forma aglicona. Jorge (2004) verificou que um glicosídeo do canferol, o canferol-3,7-O-(α)-diramnosídeo possui efeito estimulatório na captação de glicose no músculo sóleo de animais normais e, agora, constatamos o efeito de outro glicosídeo na captação de glicose. Estes resultados nos levam a sugerir que o efeito destes flavonóides glicosilados, tanto na redução da glicemia, quanto na captação de glicose necessitam da presença de açúcares ligados ao núcleo fundamental flavonoídico, uma vez que a aglicona não demonstrou efeito na glicemia nem na captação de glicose. Provavelmente esses açúcares direcionem a molécula para o transportador de glicose iniciando assim uma ação insulino-mimética.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

1. O canferol-3-neohesperidosídeo estimulou a captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo de ratos normais com baixas concentrações (100 e 1,0 nM) e este estímulo foi percentualmente similar à eficácia e à potência da insulina na concentração de 7,0 nM.
2. O efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo depende da atividade de PI-3K (via da translocação do GLUT 4).
3. O efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo envolve, pelo menos, em parte, a ativação de PKC.
4. A via de MAPK e a transcrição gênica não estão diretamente relacionadas com o efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo, neste período estudado.
5. O efeito estimulatório do canferol-3-neohesperidosídeo na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo não envolve a síntese de novos transportadores.
6. O canferol-3-neohesperidosídeo não potencia o efeito estimulatório da insulina na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo, sugerindo uma ação na mesma via de transdução de sinais da insulina.

7. O canferol-3-neohesperidosídeo aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio muscular de ratos diabéticos no tempo de tratamento estudado.
8. A quercetina estimulou a captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo com a concentração de 100 μM de forma semelhante à insulina, no entanto, não potencializou nem inibiu o efeito deste hormônio na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo de ratos normais.
9. O canferol (aglicona) não apresentou efeito na captação de [^{14}C]DG no músculo sóleo de ratos normais.
10. O canferol 3-O- β -L-ramnopiranosil- β -D-glicopiranosídeo-7-O- α -L-ramnopiranosídeo não foi capaz de reduzir a glicemia de animais diabéticos tratados com diferentes doses pelas vias oral e intraperitoneal em nenhum dos tempos estudados.

7 PERSPECTIVAS

Considerando que o canferol-3-neohesperidosídeo foi efetivo como agente insulino-mimético e apresentou ação num tecido-alvo da insulina; aumentando a captação de glicose e o conteúdo de glicogênio no músculo; as perspectivas deste grupo são determinar os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} deste composto na captação de glicose no músculo; a síntese de glicogênio, bem como, a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (glicogênio sintase, hexocinase, glicocinase).

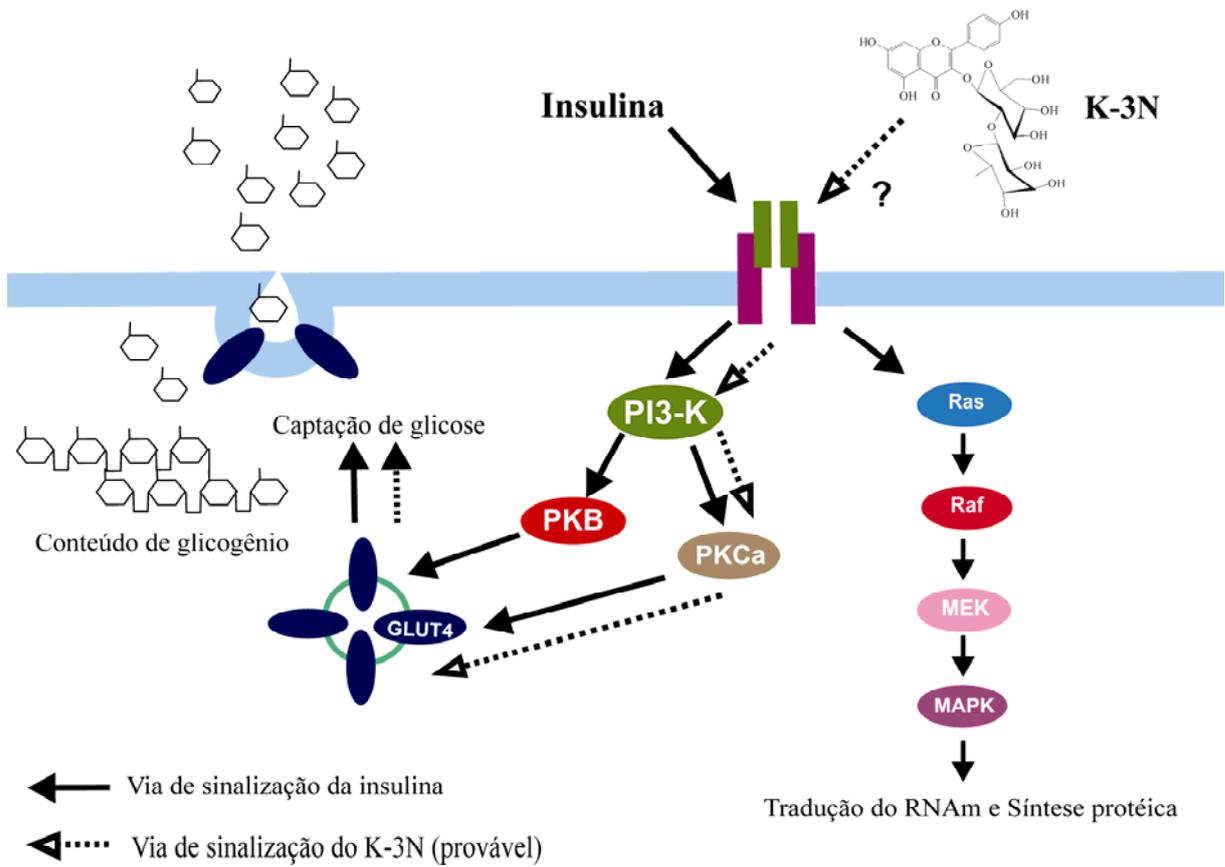


Figura 30. Diagrama esquemático da captação de $[^{14}\text{C}]\text{DG}$ estimulada por canferol-3-neohesperidosídeo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BARRY, J.A.; ABDEL-HASSAN, I.A.; AL-HAKIEM, M.H.H. Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Trigonella foenum-graecum* leaf in normal and alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, p. 149-155, 1997.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; REMESY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1649-1657, 1997.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 5592-5595, 1987.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N. M. Dietary Flavonols: Chemistry, Food Content, and Metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALARCON-AGUILAR, F.J.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R.; ROMAN-RAMOS, R. Hypoglycaemic effect of extracts and fractions from *Psicalium decompositum* in healthy and alloxan-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 21-27, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. All About Diabetes. Disponível em: <<http://www.diabetes.org/about-diabetes.jsp>>. Acesso em: 02 set. de 2006.

ANANDHARAJAN, R.; JAIGANESH, S.; SHANKERNARAYANAN, N.P.; VISWAKARMA, R.A.; BALAKRISHNAN, A. *In vitro* glucose uptake activity of *Aegles marmelos* and *Syzygium cumini* by activation of Glut-4, PI3 kinase and PPAR γ in L6 myotubes. **Phytomedicine**, v. 13, p. 434-441, 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabete. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 325-348, 2005.

ANTON, S.; MELVILLE, L.; RENA, G. Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. **Cellular Signalling**, 2006. No prelo. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>>. Acesso em: 20 set. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10520: Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: Informação e documentação: trabalhos acadêmicos - apresentação. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: Informação e documentação: referências - elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ARAI, Y.; KOIDE, N.; OHKI, F.; AGETA, H.; YANG, L.L.; YEN, K.Y. Fern constituents: Triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea spinulosa*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, p. 228-232, 1994.

ARAI, Y.; HIROHARA, M.; MATSUHIRA, M.; TOYOSAKI, K.; AGETA, H. Fern constituents: Triterpenoids isolated from leaflets of *Cyathea lepifera*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, p. 1849-1852, 1995.

AVIGNON, A.; YAMADA, K.; ZHOU, X.; SPENCER, B.; CARDONA, O.; SABASIDDIQUE, S.; GALLOWAY, L.; STANDAERT, M.L.; FARESE, R.V. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic Goto-kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. **Diabetes**, v. 45, p. 1396-1404, 1996.

BALY, D.L.; HORUK, R. Dissociation of insulin-stimulated glucose transport from the translocation of glucose carriers in rat adipose cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 21-24, 1987.

BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S.; ROBLES, S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 81, p. 19-28, 2003.

BAZUINE, M.; VAN DEN BROEK, P.J.A.; MAASSEN, J.A. Genistein directly inhibits GLUT 4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, p. 511-514, 2005.

BEARDSALL, K.; YUEN, K.; WILLIAMS, R.; DUNGER, D. Applied physiology of glucose control. **Current Paediatrics**, v. 13, p. 543-548, 2003.

BETHEL, M.A.; FEINGLOS, M.N. Basal insulin therapy in type 2 diabetes. **The Journal of the American Board of Family Practice**, v. 18, p. 199-204, 2005.

BHATHENA, S.J.; VELÁSQUEZ, M.T. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 76, p. 1191-1201, 2002.

BRAIMAN, L.; ALT, A.; KUROKI, T.; OHBA, M.; BAK, A.; TENNENBAUM, T.; SAMPSON, S.R. Activation of protein kinase C ζ induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT 4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 7852-7861, 2001.

BRINGMANN, G.; GÜNTHER, C.; JUMBAM, D.N. Isolation of 4-O- β glucopyranosylcaffeic acid and gallic acid from *Cyathea dregei* Kunze (Cyatheaceae). **Pharmaceutical Pharmacological Letters**, v. 9, p. 41-43, 1999.

BRUNTON, S.; CARMICHAEL, B.; FUNNELL, M.; LORBER, D.; RAKEL, R.; RUBIN, R. Type 2 diabetes: the role of insulin. **The Journal of Family Practice**, p. 445-452, 2005. Suplemento

CAMPBELL, I.W.; MARIZ, S. β -Cell preservation with thiazolidinediones. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 76, p. 163-176, 2007.

CARICATI-NETO, A.; PEREIRA, O.C.M.; BASTOS-RAMOS, W.P. Effects of the aqueous and alcoholic extracts of *Bauhinia forficata* on blood glucose in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p. 726A, 1985.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 419-425, 2002.

CAZAROLLI, L. H. **Estudo da Atividade de Flavonóides e de Complexos de Vanádio na Glicemia de Ratos Diabéticos Induzidos com Aloxana**, 2004. Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; JORGE, A.P.; DE SOUSA, E.; HORST, H.; WOEHL, V.M.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M B. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti hyperglycemic potential role in diabetes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, p. 177-191, 2006.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1998.

CERMAK, R.; LANDGRAF, S.; WOLFFRAN, S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brush-border-membrane vesicles of porcine jejunum. **British Journal of Nutrition**, v. 91, p. 949-855, 2004.

CHEN, Z.P.; BANDYOPADHYAY, G.; SAJAN, M.P.; KANO, Y.; STANDAERT, M.; FARESE JR., R.V.; FARESE, R.V. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise- and iminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 23554-23562, 2002.

CHENG, A.Y.Y.; FANTUS, I.G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, p. 213-226, 2005.

CHIVIAN, E. **Biodiversity: Its Importance to Human Health**. Center for Health and the Global Environment Harvard Medical School, 2002.

CHOI, S.B.; WHA, J.D.; PARK, S. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway. **Life Sciences**, v. 75, p. 2653-2664, 2004.

CUNHA, P.; VERDI, L.G.; PIZZOLATTI, M.G.; MONACHE, F.D. Estudo fitoquímico da *Cyathea phalerata*. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas, Brasil. Anais da (...) 2003, v. 1, p. 122-122.

CUNNINGHAM, P.; AFZAL-AHMED, I.; NAFTALIN, R.J. Docking studies show that D-glucose and quercetin slide through the transporter GLUT1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 5797-5803, 2006.

DA SILVA, K.L.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL FILHO, V. Phytochemical and pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift Naturforschung**, v. 55, p. 478- 480, 2000.

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

DAUGHERTY, K.K. Review of insulin therapy. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 17, p. 10-19, 2004.

DAVIES, S.P.; REDDY, H.; CAIVANO, M.; COHEN, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 1, p. 95-105, 2000.

DA VIOLANTE, G.; ZERROUK, N.; RICHARD, I.; PROVOT, G.; CHAUMEIL, J.C.; ARNAUD, P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell Cultures. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1600-1603, 2002.

DAVIS, P.D.; HILL, C.H.; KEECH, E.; LAWTON, G.; NIXON, J.S.; SEDGWICK, A.D.; WADSWORTH, J.; WESTMACOTT, D.; WILKINSON, S.E. Potent selective inhibitors of protein kinase C. **FEBS**, v. 259, p. 61-63, 1989.

DEFRONZO, R.A. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, p. 281-303, 1999.

DE SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R.M.B. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.

DESVERGNE, B.; MICHALIK, L.; WAHLI, W. Transcriptional regulation of metabolism **Physiological Reviews**, v. 86, p. 465-514, 2006.

DUNN, J.S.; LETCHIE, N.G.B. Experimental alloxan diabetes in the rat. **Lancet**, v. 2, p. 384-387, 1943.

ELDOR, R.; STERN, E.; MILICEVIC, Z.; RAZ, I. Early use of insulin in type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 68, p. 30-35, 2005. Suplemento.

FISCHER, L. Drugs and chemicals that produce diabetes. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 6, p. 72-75, 1985.

FRYER, L.G.D.; PARBU-PATEL, A.; CARLING, D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 25226-25232, 2002.

GALLEGO, M.R. Terapêutica oral da diabetes tipo 2. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 575-84, 2005.

GILLESPIE, K.M. Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. **Canadian Medical Association Journal**, v. 175, p. 165-170, 2006.

GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochemie**, v. 84, p. 99-109, 2005.

HANSOTIA, T.; DRUCKER, D.J. GIP and GLP-1 as incretin hormones: Lessons from single and double incretin receptor knockout mice. **Regulatory Peptides**, v. 128, p. 125-134, 2005.

HARDIKAR, A.A. Role of Incretins in pancreas growth and development. **J Pancreas (Online)**, v. 5, p. 454-456, 2004.

HARMON, A.W.; PATEL, Y.M. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, p. 229-234, 2003.

HARMON, A.W.; PAUL, D.S.; PATEL, Y.M. MEK inhibitors impair insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 287, p. E758-E766, 2004.

HAVSTEEN, B.H. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HE, A.; LIU, X.; LIU, L.; CHANG, Y.; FANG, F. How many signals impinge on GLUT 4 activation by insulin? **Cellular Signalling**, 2006. No prelo. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=pubmed>>. Acesso em: 15 out. 2006.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.

HENQUIN, J.C.; NENQUIN, M.; STIERNET, P.; AHREN B. *In vivo* and *in vitro* glucose-induced biphasic insulin secretion in the mouse pattern and role of cytoplasmic Ca^{2+} and amplification signals in β -cells. **Diabetes**, v. 55, p. 441-451, 2006.

HERMANSEN, K.; FONTAINE, P.; KUKOLJA, K.K.; PETERKOVA, V.; LETH, G.; GALL, M.A. Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, p. 622-629, 2004.

HIRAOKA, A.; HASEGAWA, M. Flavonoid glycosides from five *Cyathea* species. **Bot. Mag. Tokio**, v. 88, p. 127-130, 1975.

HIRAOKA, A.; MAEDA, M.; A new acylated flavonol glycoside from *Cyathea contaminans* Copel. and its distribution in the Pterophyta. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 3130-3136, 1979.

HO, R.C.; ALCAZAR, O.; FUJII, N.; HIRSHMAN, M.F.; GOODYEAR, L.J. p38 γ MAPK regulation of glucose transporter expression and glucose uptake in L6 myotubes and mouse skeletal muscle. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, p. R342-R349, 2004.

HODGKINSON, C.P.; MANDER, A.; SALE, G.J. Identification of 80K-H as a protein involved in GLUT 4 vesicle trafficking. **Biochemical Journal**, v. 388, p. 785-793, 2005.

HSU, F.L.; LIU, I.M.; KUO, D.H.; CHEN, W.C.; SU, H.C.; CHENG, J.T. Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 788-792, 2003.

HSU, H.H.; CHANG, C.K.; SU, H.C.; LIU, I.M.; CHENG, J.T. Stimulatory effect of puerarin on α _{1A}-adrenoceptor to increase glucose uptake into cultured C2C12 cells of mice. **Planta Medica**, v. 68, p. 999-1003, 2002.

HUPPERTZ, C.; FISCHER, B.M.; KIM, Y.B.; KOTANI, K.; VIDAL-PUIG, A.; SLIEKER, L.J.; SLOOP, K.W.; LOWELL, B.B.; KAHN, B.B. Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 2520-2529, 2001.

HUTCHINSON, D.S.; BENGTSSON, T. α _{1A}-adrenoceptors activate glucose uptake in L6 muscle cells through a phospholipase C-, phosphatidylinositol-3 kinase-, and atypical protein kinase C-dependent pathway. **Endocrinology**, v. 146, p. 901-912, 2005.

ISLAS-ANDRADE, S.; MONSALVE, M.C.R.; DE LA PEÑA, J.E.; POLANCO, A.C.; PAMOLINO, M.A.; VELASCO, A.F. Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: comparison of the two models in rats. **Acta Histochemistry Citochemistry**, v. 33, p. 201-208, 2000.

JONES, T.L.Z.; CUSHMAN, S.W. Acute effects of cycloheximide on the translocation of glucose transporters in rat adipose cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 7874-7877, 1989.

JORGE, A.P. Efeito insulino-mimético do canferol 3,7-O-(α)-L-diramnosídeo na glicemia e na captação da 2-[¹⁴C (U)]-deoxi-D-glicose em músculo sóleo de ratos. 2003. Dissertação de mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

JORGE, A.P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v. 149, p. 9-96, 2004.

JULIANI, C. Ação hipoglicemiante da Unha-de-Vaca. **Revista Médica Farmacologia, Química e Fisiologia**, v. 2, p. 165-169, 1929.

JULIANI, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos experimentais. **Revista Sudamericana de Endocrinologia, Imunologia e Quimioterapia**, v. 14, p. 326-334, 1931.

JULIANI, C.; Ação hipoglicemiante da *Bauhinia forficata* Link. Novos estudos clínicos e experimentais. **Jornal dos Clínicos**, v. 3, p. 93-112, 1941.

JUNG, U.J.; LEE, M.K.; JEONG, K.S.; CHOI, M.S. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 2499-2503, 2004.

KAMALAKKANNAN, N.; PRINCE, P.S.M. Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 98, p. 97-103, 2006.

KHAN, A.H.; THURMOND, D.C.; YANG, C.; CERESA, B.P.; SIGMUND, C.D.; PESSIN, J.E. Munc18c regulates insulin-stimulated GLUT 4 translocation to the transverse tubules in skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 4063-4069, 2001.

KHAN, A.H.; PESSIN, J.E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**, v. 45, p. 1475-1483, 2002.

KLIP, A.; TSAKIRIDIS, T.; MARETTE, A.; ORTIZ, P.A. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies *in vivo* and in cell cultures. **The FASEB Journal**, v. 8, p. 43-53, 1994.

KIM, H.; AHN, Y. Role of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in the glucose-sensing apparatus of liver and β -cells. **Diabetes**, v. 53, p. S60-S65, 2004.

KONO, T.; SUZUKI, K.; DANSEY, L.E.; ROBINSON, F.W.; BLEVINS, T.L. Energy-dependent and protein synthesis-independent recycling of the insulin-sensitive glucose transport mechanism in fat cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, p. 6400-6407, 1981.

KOSKI, R.R. Oral antidiabetic agents: a comparative review. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 17, p. 39-48, 2004.

KRISMAN, C.R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Analytical Biochemistry**, v. 4, p. 14-23, 1962.

KROOK, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J.R. Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 36, p. 1212-1217, 2004.

LARSON, L. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, p. 959-978, 1988.

LAZAR, D.F.; WIESE, R.J.; BRADY, M.J.; MASTICK, C.C.; WATERS, S.B.; YAMAUCHI, K.; PESSIN, J.E.; CUATRECASAS, P.; SALTIEL, A.R. Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 20801-20807, 1995.

LEDUC, C.; COONISHISH, J.; HADDAD, P.; CUERRIER, A. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 55-63, 2006.

LEE, J.S. Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 79, p. 1578-1584, 2006.

LIN, Y.L.; CHOU, C.K. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the regulation of hepatitis B surface antigen production and mitogen-activated protein kinase activation by insulin but not by TPA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 172-175, 1998.

LINO, C.S.; DIÓGENES, J.P.; PEREIRA, B.A.; FARIA, R.A.; ANDRADE NETO, A.; ALVES, R.S.; DE QUEIROZ, M.G.; DE SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Antidiabetic activity of *Bauhinia forficata* extracts in alloxan-diabetic rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 125-127, 2004.

LIU, I.M.; LIOU, S.S.; LAN, T.W.; HSU, F.L.; CHENG, J.T. Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta medica**, v.71, p. 617-621, 2005.

LIU, L.Z.; HE, A.B.; LIU, X.J.; CHANG, Y.S.; FANG, F.D. Protein kinase C ζ and glucose uptake. **Biochemistry (Moscow)**, v. 71, p. 701-706, 2006.

LIU, X.J.; HE, A.B.; CHANG, Y.S.; FANG, F.D. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. **Cellular Signalling**, v. 18, p. 2071-2076, 2006.

MACHADO, U.F.; SCHAAN, B.D.; SERAPHIM, P.M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 177-189, 2006.

MACÍA, M.J.A. Comparison of useful Pteridophytes between two amerindian groups from Amazonian Bolivia and Ecuador. **American Fern Journal**, v. 94, p. 39-46, 2004.

MALECKI, M.T.; KLUPA, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. **Pharmacological reports**, v. 57, p. 20-32, 2005. Suplemento.

MARTIN, H.J.; KORNMANN, F.; FUHRMANN, G.F. The inhibitory effects of flavonoids and antiestrogens on the Glut 1 glucose transporter in human erythrocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 146, p. 225-235, 2003.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas Mediciniais**. Editora da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 1998.

MATTHAEI, S.; OLEFSKY, J.M.; KARNIELI, E. Cycloheximide decreases glucose transporters in rat adipocyte plasma membranes without affecting insulin-stimulated glucose transport. **Biochemical Journal**, v. 251, p. 491-497, 1988.

MCGARRY, J.D.; DOBBINS, R.L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v. 42, p. 128-138, 1999.

MCINTOSH, C.H.S.; DEMUTH, H.U.; KIM, S.J.; POSPISILIK, J.A.; PEDERSON, R.A. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 860–872, 2006.

MEEZAN, E.; MEEZAN, E.M.; JONES, K.; MOORE, R.; BARNES, S.; PRASAIN, J.K. Contrasting effects of puerarin and daidzin on glucose homeostasis in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8760-8767, 2005.

MENEGAZ, D.; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A.; SILVA, F.R.M.B. Rapid responses to thyroxine in the testis: Active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p. 128-134, 2006.

MIAN, N.; ANDERSON, C.E.; KENT, P.W. Effect of sulphated glycopeptides on kinetics of 3-O-methylglucose and 2-deoxy-glucose transport by epithelial cells isolated from rabbit small intestine. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, p. 197-204, 1979.

MOLLER, D.E. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. **Nature**, v. 414, p. 821-827, 2001.

MOORE, O.H.; CHERRINGTON, A.D.; WASSERMAN, D.H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, p. 343-364, 2003.

MUROTA, K.; TERÃO, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NAFTALIN, R.J.; AFZAL, I.; CUNNINGHAM, P.; HALAI, M.; ROSS, C.; SALLEH, N.; MILLIGAN, S.R. Interactions of androgens, green tea catechins and the antiandrogen flutamide with the external glucose-binding site of the human erythrocyte glucose transporter GLUT1. **British Journal of Pharmacology**, v. 140, p. 487-499, 2003.

NISHITANI, S.; MATSUMURA, T.; FUJITANI, S.; SONAKA, I.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Leucina promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 299, p. 693-696, 2002.

NOLTE, L.A.; HAN, D.H.; HANSEN, P.A.; HUCKER, K.A.; HOLLOSZY, J.O. A peroxovanadium compound stimulates muscle glucose transport as powerfully as insulin and contractions combined. **Diabetes**, v. 52, p. 1918-1925, 2003.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. **Hormones**. Second edition. Academic Press, 1997.

NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. **Cellular Signalling**, v. 11, p. 563-574, 1999.

O'BRIEN, R.M.; GRANNER, D.K. Regulation of gene expression by insulin. **Physiological Reviews**, v. 76, p. 1109-1161, 1996.

ONG, K.C.; KHOO, H. Insulinomimetic effects of myricetin on lipogenesis and glucose transport in rat adipocytes but not glucose transporter translocation. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, p. 423-429, 1996.

ONG, K.C.; KHOO, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 1695-1705, 2000.

PARK, J.B. Flavonoids are potential inhibitors of glucose uptake in U937 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 568-574, 1999.

PARK, J.B.; LEVINE, M. Intracellular accumulation of ascorbic acid is inhibited by flavonoids via blocking of dehydroascorbic acid and ascorbic acid uptakes in HL-60, U937 and Jurkat cells. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1297-1302, 2000.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry, theoretical and applied**. v.1, London: Churchill Livingstone, 1968.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT, I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 191-197, 2002.

PEPATO, M.T.; BAVIERA, A.M.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Evaluation of toxicity after one-month treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, p. 1-7, 2004.

PERREIRA, L.O.; LANCHA JR., A.H. Effect of insulin and contraction up on glucose transport in skeletal muscle. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v. 84, p. 1-27, 2004.

PINENT, M.; BLAY, M.; BLADE, M.C.; SALVADO, M.J.; AROLA, L.; ARDEVOL, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. **Endocrinology**, v. 145, p. 4985-4990, 2004.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA JR, A.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.

PRINCE, P.S.M; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 20, p. 96-102, 2006.

PURINTRAPIBAN, J.; SUTTAJIT, M.; FORSBERG, N.E. Differential activation of glucose transport in cultured polyphenolic compounds from *Canna indica* L. root. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 1995-1998, 2006.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001

RICHTER, E.A. Glucose metabolism in skeletal muscle. **Pathophysiology**, v. 5, p. 119, 1998.

ROACH, P.J. Glycogen and its Metabolism. **Current Molecular Medicine**, v. 2, p. 101-120, 2002.

RODRIGUEZ, E.; PULIDO, N.; ROMERO, R.; ARRIETA, F.; PANADERO, A.; ROVIRA, A. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for sulfonylurea stimulation of glucose transport in rat skeletal muscle. **Endocrinology**, v. 145, p. 679-685, 2004.

ROGLIC, G.; UNWIN, N.; BENNETT, P.H.; MATHERS, C.; TUOMILEHTO, J.; NAG, S.; CONNOLLY, M.; KING, H. The burden of mortality attributable to diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, p. 2130-2135, 2005.

ROMEIS, B. **Guia Formulário de Técnica Histológica**. 11. ed. Barcelona: Labor, 1928.

RUSSO, E.M.K.; REICHELT, A.A.J.; DE-SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.S.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 23, p. 11-20, 1990.

SALTIEL, A.R.; KAHN, C.R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SAMPSON, S.R.; COOPER, D.R. Specific protein kinase C isoforms as transducers and modulators of insulin signaling. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 89, p. 32-47, 2006.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; REMESY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomedicine and Pharmacotherapeutics**, v. 56, p. 276-282, 2002.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H.G.; SCHÜRMAN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **The Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, p. 364-371, 2004.

SHEPHERD, P.R.; NAVE, B.T.; RINCON, J.; NOLTE, L.A.; BEVAN, A.P.; SIDDLER, K.; ZIERATH, J.R.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Differential regulation of phosphoinositide 3-kinase adapter subunit variants by insulin in human skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 19000-19007, 1997.

SHETTY, A.K.; RASHMI, R.; RAJAN, M.G.R.; SAMBAIAH, K.; SALIMATH, P.V. Antidiabetic influence of quercetin in streptozotocin induced diabetic rats. **Nutrition Research**, v. 24, p. 373-381, 2004.

SHISHEVA, A.; SHECHTER, Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function *in vitro* and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. **Biochemistry**, v. 31, p. 8059-8063, 1992.

SHIH, C.M.; LIN, H.; LIANG, Y.C.; LEE, W.S.; BI, W.F.; JUAN S.H. Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, p. 41-48, 2004.

SHIN, J.S.; KIM, K.S.; KIM, M.B.; JEONG, J.H.; KIM, B.K. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, p. 869-874, 1999.

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; DE SOUSA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 33-37, 2002.

SIMÓ, R.; HERNANDEZ, C. Treatment of diabetes mellitus: general goals and clinical practice management. **Revista Española de Cardiología**, v. 55, p. 845-60, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª edição. Ed. Universidade/UFRGS/Ed UFSC, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2003. 72 p.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Diabetes Mellitus: Insulinoterapia, p. 1-7, 2005.

SONG, J.; KWON, O.; CHEN, S.; DARUWALA, R.; ECK, P.; PARK, J.B.; LEVINE M. Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1(SVCT1) and glucose transporter isoform 2(GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 15252-15260, 2002.

STANDAERT, M.L.; BANDYOPADHYAY, G.; PEREZ, L.; PRICE, D.; GALLOWAY, L.; POKLEPOVIC, A.; SAJAN, M.P.; CENNI, V.; SIRRI, A.; MOSCAT, J.; TOKER, A.; FARESE R.V. Insulin activates protein kinases C- ζ and C- λ by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT 4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 25308-25316, 1999.

STROBEL, P.; ALLARD, C.; PEREZ-ACLE, T.; CALDERON, R.; ALDUNATE, R.; LEIGHTON, F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. **Biochemical journal**, v. 386, p. 471-478, 2005.

SUGA, J.; YOSHIMASA, Y.; YAMADA, K.; YAMAMOTO, Y.; INOUE, G.; OKAMOTO, M.; HAYASHI, T.; SHIGEMOTO, M.; KOSAKI, A.; KUZUYA, H.; NAKAO, K. Differential activation of mitogen-activated protein kinase by insulin and epidermal growth factor in 3T3-L1 adipocytes: a possible involvement of PI3-kinase in the activation of the MAP kinase by insulin. **Diabetes**, v. 46, p. 735-741, 1997.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.

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

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA, G.N.; MATHE, G. Polyphenols: do they play a role in prevention of human pathologies? **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 200-207, 2002.

UI, M.; OKADA, T.; HAZEKI, O. Wortmannin as a unique probe for an intracellular signaling protein, phosphoinositide 3-kinase. **TIBS**, v. 20, p. 303-307, 1995.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.H.; BELL, M. Hormones, vitamins, drugs poisons. In: HEINEMANN, I.W. **Practical Clinical Biochemistry**, 5^a ed., vol. 2, London, 1976.

VATS, V.; YAMADA, S.P.; GROVER, J.K. Ethanolic extract of *Ocimum santum* leaves partially attenuates streptocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, p. 155-160, 2003.

VATS, R.K.; KUMAR, V.; KOTHARI, A.; MITAL, A.; RAMACHANDRAN, U. Emerging targets for diabetes. **Current Science**, v. 88, p. 241-249, 2005.

VELUSSI, M.; CERNIGOI, A.M.; DE MONTE, A.; DAPAS, F.; CAFFAU, C.; ZILLI, M. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. **Journal of Hepatology**, v. 26, p. 871-879, 1997.

VESSAL, M.; HEMMATI, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p. 357-364, 2003.

VERSPOHL, E.J. Recommended testing in diabetes research. **Planta Medica**, v. 68, p. 581-590, 2002.

VLAHOS, C.J.; MATTER, W.F.; HUI, K.Y.; BROWN, R.F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-(LY294002). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 5241-5248, 1994.

WALKER, P.S.; RAMLAL, T.; SARABIA, V.; KOIVISTO, U.M.; BILAN, P.J.; PESSIN, J.E.; KLIP, A. Glucose transport activity in L6 muscle cells is regulated by the coordinate control of subcellular glucose transporter distribution, biosynthesis, and mRNA transcription. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 1516-1523, 1990.

WALKER, E.H.; PACOLD, M.E.; PERISIC, O.; STEPHENS, L.; HAWKINS, P.T.; WYMANN, M.P.; WILLIAMS, R.L. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by Wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. **Molecular Cell**, v. 6, p. 909-919, 2000.

WALLACE, J. Chemosystematic implications of flavonoids and C- glycosylxanthenes in Ferns. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 17, p. 145-153, 1989.

WALTNER-LAW, M.E.; WANG, X.L.; LAW, B.K.; HALL, R.K.; NAWANO, M.; GRANNER, D.K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34933-34940, 2002.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT 4 translocation. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 56, p. 175-194, 2001.

WHO, World Health Organization. Diabetes. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/print.html>>. Acesso em: 05 set. 2006a.

WHO, World Health Organization. Diabetes mellitus. Disponível em:
<http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/>. Acesso em: 05 set. 2006b.

WHO, World Health Organization. Prevalence of diabetes worldwide. Disponível em:
<http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/>. Acesso em: 21 out. 2006c.

WHO, World Health Organization. Prevalence of diabetes in the WHO Region of the Americas. Disponível em:<http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html>. Acesso em: 21 out. 2006d.

WIJESSEKARA, N.; THONG, F.S.L.; ANTONESCU, C.N.; KLIP, A. Diverse signals regulate glucose uptake into skeletal muscle. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 30, p. 80-88, 2006.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, p. 1047-1056, 2004.

WOJTASZEWSKI, J.F.P.; LYNAGE, J.; JAKOBSEN, A.B.; GOODYEAR, L.J.; RICHTER, E.A. Differential regulation of MAP kinase by contraction and insulin in skeletal muscle: metabolic implications. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 277, p. E724-E732, 1999.

WOOD, I.S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **British Journal of Nutrition**, v. 89, p. 3-9, 2003.

WU, L.Y.; JUAN, C.C.; HWANG, L.S.; HSU, Y.P.; HO, P.H.; HO, L.T. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. **European Journal of Nutrition**, v. 43, p. 116-124, 2004.

YEH, G.Y.; EISENBERG, D.M.; KAPTCHUK, T.J.; PHILLIPS, R.S. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1277-1294, 2003.

YOUNG, D.A.; UHL, J.J.; CARTEE, G.D.; HOLLOSZY, J.O. Activation of glucose transport in muscle by prolonged exposure to insulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 261, p. 16049-16053, 1986.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R.M.B., PESSOA-PUREUR, R. Involvement of calcium-dependent mechanisms in T₃-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Science**, v. 77, p. 3321-3335, 2005.

ZARZUELO, A.; JIMENEZ, I.; GAMEZ, M.J.; UTRILLA, P.; FERNADES, I.; TORRES, M.I.; OSUNA, I. Effects of luteolin 5-0- β -rutinoside in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sciences**, v. 58, p. 2311-2316, 1996.

ZAVERI, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and non cancer applications. **Life Sciences**, v. 78, p. 2073-2080, 2006.

ŽDYCHOVÁ, J.; KOMERS, R. Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. **Physiological Research**, v. 54, p. 1-16, 2005.

ZHAO, H.; YAKAR, S.; GAVRILOVA, O.; SUN, H.; ZHANG, Y.; KIM, H.; SETSER, J.; JOU, W.; LEROITH D. Phloridzin improves hyperglycemia but not hepatic insulin resistance in a transgenic mouse model of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, p. 2901-2909, 2004.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M.F.; GOODYEAR, L.J.; MOLLER, D.E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 1167–1174, 2001.

ZIERATH, J.R.; KAWANO, Y. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, p. 385-398, 2003.