

**RONALDO MARTINS FERREIRA**

**EFEITO DA INFUSÃO DOS FRUTOS DE  
*Momordica charantia* L. EM RATAS DIABÉTICAS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA**  
**MINAS GERAIS – BRASIL**  
**2008**

**RONALDO MARTINS FERREIRA**

**EFEITO DA INFUSÃO DOS FRUTOS DE  
*Momordica charantia* L. EM RATAS DIABÉTICAS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de dezembro de 2008.

---

Prof<sup>a</sup>. Tânia Toledo de Oliveira  
Co-orientadora

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Cláudia Peres Rodrigues

---

Prof<sup>a</sup>. Regina Celi de Carvalho Costa

---

Prof. João Paulo Viana Leite

---

Prof. George Henrique Kling de Moraes  
Orientador

Aos meus pais, Nilson Martins Ferreira (*in memoriam*) e Olívia de Almeida Martins, por suas histórias de sucesso na educação dos filhos, diante de todas as adversidades.

À minha querida esposa, Maria de Fátima Colucci Goulart dos Santos, que me ensinou as prioridades na vida.

À minha filha, Mariana Colucci Goulart Martins Ferreira, motivo de entusiasmo e paixão pela vida.

Aos meus estudantes dos cursos de Medicina e de Farmácia da Universidade Presidente Antônio Carlos, incentivo maior de minha vida acadêmica.

## **AGRADECIMENTOS**

Os pesquisadores são seres sociais e, como tal, não vivem isolados da sociedade em que fazem pesquisa, nem das transformações, dos desenvolvimentos, das injustiças, das lutas e da falta de consciência social que na mesma se verificam; como todos os outros cidadãos, têm problemas, dúvidas, sofrem de solidão, apaixonam-se, são mais ou menos felizes, têm mais ou menos auxílios no exercício da atividade que escolheram seguir, têm mais ou menos amigos. Apesar das muitas dificuldades (econômicas, institucionais, de isolamento, de solidão) que ainda hoje incomodam a quem faz um doutoramento no Brasil, a dissertação que aqui apresento e a investigação que à mesma conduziu contaram com vários apoios – alguns inesperados, outros menos, outros ainda como o corolário natural de relações de amizade intensas. É, por isso, um prazer enunciar cada um deles e proceder ao seu reconhecido agradecimento.

Em primeiro lugar, destaco o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa e a Faculdade de Medicina de Barbacena, da Universidade Presidente Antônio Carlos, e aos seus setores de avaliação e financiamento de projetos, aos quais agradeço o reconhecimento da validade do projeto de investigação que lhes submeti e o financiamento, que no decorrer desse reconhecimento me atribuíram.

Se o reconhecimento da validade do projeto e o financiamento foram importantes para este trabalho, não menos

determinante foi a orientação do Professor George Henrique Kling de Moraes, PhD, com quem venho trabalhando desde os tempos do meu curso de mestrado. Durante esses anos, os seus conselhos, as críticas ou os louvores a aspectos da minha investigação foram apenas uma parcela mínima e a continuação natural da amizade que nos une. Ao Professor devo parte da minha formação como pesquisador e docente de Bioquímica, é certo, mas ao amigo devo mais do que os ensinamentos que cabem no espaço de uma tese.

A Professora Tânia Toledo de Oliveira, Doutora, é outro caso sério de amizade, paciência e resistência, desde os tempos de minha qualificação no mestrado, quando foi minha co-orientadora. Entre tantas outras coisas, devo-lhe as leituras atentas e críticas de tudo quanto escrevi sobre ciências, incluindo esta dissertação.

Grato ao grupo de colegas Cyntia C. Andrade, Denise S. Neto, André A. M. Souza e Marcos Locarno pelo seu envolvimento, de diversas maneiras, na execução do projeto. Igual agradecimento retorno ao meu irmão Fernando, à Maria Helena, à Valdênia e ao Cosme.

Por último, uma gratidão especial ao Gustavo Gontijo e a Heloísa Goés, pela compreensão, pelo carinho, pela motivação, pela inserção e por estarem sempre disponíveis em todos os momentos de nossa empreitada.

## **BIOGRAFIA**

RONALDO MARTINS FERREIRA, filho de Nilson Martins Ferreira e de Olívia de Almeida Martins, nasceu em 22 de outubro de 1952, em Barbacena, Minas Gerais.

Graduou-se em Farmácia e Bioquímica, pela Universidade Federal de Juiz de Fora, em dezembro de 1977.

Ingressou na Escola Preparatória de Cadetes do Ar (EPCAr), como professor de Química, em julho de 1980.

Especializou-se em Química, pela Universidade Federal de Lavras, em janeiro de 1984.

Em janeiro de 1984, ingressou na Faculdade de Medicina de Barbacena, no Departamento de Morfologia e Fisiologia, como professor de Bioquímica Celular e de Química Fisiológica.

Em dezembro de 1993, transferiu-se da EPCAr para a Escola Agrotécnica Federal de Barbacena – EAFB, ministrando aulas para os cursos técnicos pós-médio em Nutrição, Enfermagem e Segurança do Trabalho.

Em junho de 2004, assumiu a Direção do Instituto de Biociências – INBIO, da Universidade Presidente Antônio Carlos, que agrega o curso de Farmácia e o curso de Biotecnologia.

Em março de 2003 iniciou o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em julho de 2004.

Em janeiro de 2005, assumiu a Direção da Faculdade de Saúde de Barbacena – FASAB, da Universidade Presidente Antônio Carlos, que engloba os cursos de Enfermagem, Nutrição, Educação Física, Fisioterapia e Fonoaudiologia.

Em agosto de 2004 iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua tese em dezembro de 2008.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....   | ix |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | xi |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 01 |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....   | 05 |
| 2.1. <i>Diabetes mellitus</i> , a epidemia do século XXI.....                               | 05 |
| 2.2. Regulação da glicemia.....   | 11 |
| 2.3. Fisiopatologia da hiperglicemia pós-prandial .....                                     | 12 |
| 2.4. Hiperglicemia pós-alimentar e morbimortalidade cardiovas-<br>cular.....                | 16 |
| 2.5. Os fatores de risco cardiovasculares não-tradicionais e o<br>estado pós-alimentar..... | 18 |
| 2.6. Estresse oxidativo da parede vascular e a disfunção endotelial<br>pós-prandial.....    | 18 |
| 2.7. Influência da hiperglicemia pós-prandial.....  | 19 |
| 2.8. O peptídeo C.....  | 21 |
| 2.9. O peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP).....                                    | 26 |
| 2.10. Importância das plantas medicinais.....   | 29 |
| 2.11. Histórico da <i>Momordica charantia</i> L.....  | 30 |
| 2.12. Indução do <i>Diabetes mellitus</i> .....   | 35 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 39 |
| 3.1. Objetivo geral .....   | 39 |
| 3.2. Objetivos específicos .....  | 39 |

|   |    |
|---|----|
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                              | 40 |
| 4.1. Material botânico.....                                     | 40 |
| 4.2. Preparação da infusão.....                                 | 40 |
| 4.3. Animais.....   | 40 |
| 4.4. Indução do <i>Diabetes mellitus</i> experimental.....      | 41 |
| 4.5. Seleção, distribuição e tratamento dos animais.....        | 42 |
| 4.6. Determinação do peso, da ingestão hídrica e alimentar..... | 42 |
| 4.7. Dosagem da glicemia casual e hemoglobina glicada.....      | 43 |
| 4.8. Dosagens imunoenzimáticas.....                             | 43 |
| 4.9. Tratamento estatístico.....                                | 44 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                          | 45 |
| 5.1. Método de indução.....                                     | 45 |
| 5.2. Evolução clínica.....                                      | 48 |
| 5.3. Evolução laboratorial.....                                 | 51 |
| 5.3.1. Glicemia e hemoglobina glicada.....                      | 51 |
| 5.3.2. Peptídeo C, insulina e GIP.....                          | 54 |
| <b>7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....                        | 59 |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                      | 60 |

## RESUMO

FERREIRA, Ronaldo Martins, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2008. **Efeito da infusão dos frutos de *Momordica charantia* L. em ratas diabéticas.** Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Co-orientadores: Tânia Toledo de Oliveira e Giovanni Ribeiro de Oliveira.

O objetivo deste estudo foi caracterizar as alterações clínicas e laboratoriais em ratas com diabetes aloxânica e em ratas saudáveis, tratadas com infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia*. Nos ensaios biológicos, 28 ratas foram induzidas ao diabetes experimental por via intraperitoneal na dose de 75 mg/kg. A glicemia foi verificada no sexto dia após a indução e os animais com glicemia superior a 180 mg/dL foram distribuídos em dois grupos: Grupo Diabético Tratado (8 animais) e Grupo Diabético Controle (7 animais). A partir de animais saudáveis, outros dois grupos foram formados: Grupo Sadio Controle e Grupo Sadio Tratado, cada um com 7 animais. Os tratados receberam dose diária de 1 mL/250g de peso corporal da infusão preparada a 10%, e os animais dos grupos-controle, 1 mL de soro fisiológico, por um período de 25 dias. Durante o experimento foram estudados os seguintes parâmetros clínicos: peso, ingestão hídrica, ingestão alimentar, diurese e estado geral. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e as seguintes dosagens laboratoriais foram realizadas: glicemia casual, hemoglobina glicosilada, insulina, peptídeo C e peptídeo insulínico dependente (GIP). Verificou-se um aumento do peso entre os animais de todos os grupos e um maior consumo hídrico e alimentar nos grupos de animais diabéticos. Após o tratamento com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia*, o nível glicêmico dos animais

diabéticos tratados reduziu em 12,4% e o dos animais sadios tratados reduziu em 0,38%. Os valores encontrados para a hemoglobina glicada dos animais diabéticos são próximos aos considerados normais. As concentrações plasmáticas para a insulina foram menores nas ratas diabéticas do que nas ratas saudáveis. Os teores sanguíneos do peptídeo C dos animais diabéticos mostraram valores pouco menores do que os animais sadios e as concentrações plasmáticas do peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) mostraram-se 101,3% maiores nos animais diabéticos tratados do que nos animais diabéticos não-tratados e 68,0% acima dos valores encontrados para os animais do grupo controle sadio. Esses resultados revelam que a infusão aquosa dos frutos de *Momordica charantia*, é capaz de promover um aumento dos níveis plasmáticos do peptídeo insulínico glicose-dependente, promovendo então uma diminuição dos níveis glicêmicos dos animais com diabetes aloxânica.

## ABSTRACT

FERREIRA, Ronaldo Martins, D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, December of 2008. **Fruits infusion effect of *Momordica charantia* L. in female rats diabetics.** Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Co-advisers: Tânia Toledo de Oliveira and Giovanni Ribeiro de Oliveira.

The objective of this study was to characterize the clinical alterations on laboratory female rats with alloxanic diabetes and on healthy female rats, treated with aqueous infusion of powdered fruits of *Momordica charantia*. In the biological assays, 28 female rats were induced to the experimental diabetes through intraperitoneal injection in a dose of 75 mg/kg. The glycemia was verified on the sixth day after the induction and the animal with glycemia superior to 180 mg/dL were distributed in two groups: Treated Diabetic Group (8 animals) and Control Diabetic Group (7 animals). After dividing this two groups of female rats (healthy and diabetic rats), two others groups of healthy animals were formed: Control Health Group and Treated Healthy Group, which one with 7 animals. Treated animals were received a diary dose of 1 mL/250g of corporal weigh of the 10 % prepared infusion, and the groups-control animals, 1mL of physiologic serum, for 25 days. During the experiment were studied the following clinical parameters: weigh, hydric ingestion, alimentary ingestion, diuresis and general state. On the final of the experiment, the animals were euthanized and the following laboratorial dosages were realized: casual glicemy, hemoglobin, A<sub>1c</sub>, insulin, C peptide and glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Was verified weight increase among all animals of all groups and a bigger hydric and alimentary consumption in the groups of diabetic animals. After

the treatment with aqueous infusion of powdered fruits of *Momordica charantia*, the glycemic level of treated diabetic animals was reduced to 12,4% and the treated healthy animals was reduced to 0,38%. The found values to hemoglobin A<sub>1c</sub> of diabetic animals were similar to values that are considered normal. Plasmatic concentrations to the insulin were smaller in diabetic female rats than in healthy female rats. Sanguine tenors of the C peptide of diabetic animals showed values a little smaller than healthy animals and plasmatic concentration of the glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) were shown 101,3% larger in treated diabetic animals than in no-treated diabetic animals and 68,0% above of the found values for animals of healthy control group. These results reveal that the aqueous infusion of powdered fruits of *Momordica charantia* is capable to promote and increase plasmatic levels of the glucose-dependent insulintropic polypeptide, promoting a decrease of glycemic levels of animals with alloxanic diabetes.

## 1. Introdução

A investigação clínica é a chave para fazer novos medicamentos e tratamentos disponíveis para pessoas que deles necessitam. Não seria possível tratar com sucesso a diabetes como atualmente ela é tratada, sem os muitos trabalhos experimentais importantes que aconteceram ao longo dos últimos 85 anos. De fato, um dos mais emocionantes momentos da história médica envolveu um trabalho de pesquisa testando um hormônio recém-descoberto, a insulina. Em 1921, o cirurgião canadense Dr. Frederico G. Banting e seu assistente, o estudante Charles H. Best, iniciaram sua pesquisa com a substância pancreática que poderia tratar o diabetes. Eles foram bem sucedidos e, depois de se associarem ao bioquímico James B. Collip, foram capazes de desenvolver uma forma de insulina purificada. No início de 1922, os investigadores aplicaram extratos pancreáticos (mais tarde conhecido como insulina) em cães diabéticos e, em seguida, neles mesmos, antes de aplicar injeções em um menino de 14 anos, **Leonard Thompson**, que padecia de diabetes em um hospital de Toronto. O menino, que estava sobrevivendo com a dieta de “fome” prescrita para a maioria dos diabéticos naquela época, passou a apresentar níveis de glicose no sangue muito melhores e viveu por mais treze anos. Com esta importante descoberta, o Dr. Banting ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1923 (Banting et al., 1922).

Desde então, novas atividades de investigação e desenvolvimento da insulina humana e de outras drogas conduziram a melhores tratamentos e à maior sobrevida. Hoje em dia, um adulto com diabetes pode escolher entre uma variedade de formulações de insulina e medicamentos orais.

O diabetes representa um problema importante em diversos países pela carga de sofrimento, incapacidade, perdas de produtividade e morte prematura que provoca (Murray e Lopez, 1994). Estima-se que aumentará na população mundial, devido à transição demográfica, de 2,8% (171 milhões de pessoas) para 4,4% (366 milhões), entre os anos de 2000 e 2030 (Wild et al., 2004), particularmente de maneira rápida na América Latina (Barceló e Rajpathak, 2001). No Brasil, o *Diabetes mellitus* (DM) atingia 7,6% dos adultos entre 30 e 69 anos nos fins da década de 1980 (Malerbi e Franco, 1992). Na Campanha Nacional de Detecção de DM, em 2001, 16% dos examinados com idade acima de 40 anos, apresentaram glicemia capilar média igual a 100 mg/dL em jejum ou 140 mg/dL em amostra casual (Nucci, 2004). O envelhecimento e o aumento dos níveis de obesidade da população brasileira observados nos últimos anos, certamente contribuirá para elevar a prevalência do DM (Monteiro et al., 1995).

Em função desta dura realidade, torna-se imprescindível a busca de novos princípios farmacológicos para o tratamento do DM, e a etnofarmacologia botânica constitui-se em uma valiosa fonte de informações, uma vez que é muito mais provável encontrar atividade biológica em espécies vegetais em evidência na “farmácia natural” do que em plantas escolhidas ao acaso (Cechinel-Filho e Yunes, 1998; Barbosa-Filho et al., 2006).

O melão-de-São-Caetano (*Momordica charantia* L.), da família Cucurbitaceae, é uma espécie pantropical, trepadeira, originária provavelmente do leste indiano e sul da China, monóica, raramente hermafrodita com flores amarelas solitárias nas axilas das folhas (Walters e Decker-Walters, 1988; Robinson e Decker-Walters, 1997).

No Brasil, o tipo selvagem é uma planta daninha bastante freqüente em pomares, hortas, cafezais, cercas, alambrados e terrenos

baldios (Lorenzi, 2000). A superfície do fruto é verde escura brilhante e seus frutos maduros têm um sabor de médio a fortemente amargo, exibindo deiscência irregular.

É uma espécie de valor ornamental, alimentar e medicinal. Ornamental por possuir folhas delicadas, flores amarelas brilhantes e frutos coloridos de formato incomum. Conforme Huyskens et al. (1992), Walters e Decker-Walters (1988) e Robinson e Decker-Walters (1997), os frutos imaturos (casca verde escura com polpa e sementes tenras e brancas) são bastante consumidos pelos povos asiáticos, sob a forma de conserva, recheados ou fritos, e são bastante ricos em ferro, cálcio, fósforo e vitaminas. São atribuídas à planta diversas propriedades terapêuticas tais como: antidiarréica, anti-reumática, hipoglicemiante, resolutive e afrodisíaco masculino, sendo usada popularmente contra eczemas, ferimentos, furúnculos, tumores, incômodos das hemorróidas, diarreias simples ou hemorrágica, como pesticida e, recentemente, como agente inibidor da multiplicação do vírus HIV (Grenand et al., 1987; Yang e Walters, 1992; Matos, 1997; Diniz et al., 1997; Robinson e Decker-Walters, 1997).

A atividade hipoglicemiante da espécie vegetal *Momordica charantia* está descrita em diversos trabalhos, porém, o exato mecanismo pelo qual a glicemia é afetada permanece desconhecido (Abascal e Yarnell, 2005). Os fármacos utilizados atualmente no tratamento do DM apresentam-se eficientes no controle da glicemia, entretanto nenhum deles aborda a preservação/regeneração das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas.

Sendo assim, neste trabalho efetuaram-se ensaios laboratoriais em ratas com diabetes aloxâmica, visando a detectar alterações nos níveis plasmáticos do peptídeo insulínico glicose-dependente, um

hormônio incretina secretado pelas células K intestinais e que demonstra propriedades estimulatórias para a secreção de insulina juntamente com características antiapoptóticas em células  $\beta$  pancreáticas.

## **2. Revisão de literatura**

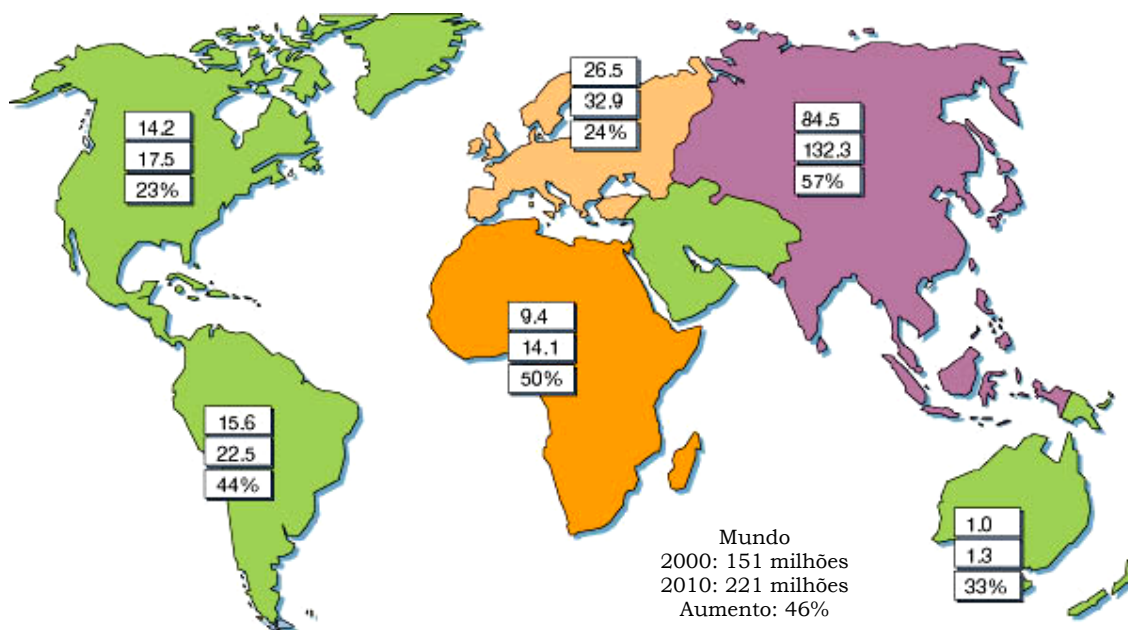
### **2.1. *Diabetes mellitus*, a epidemia do século XXI**

O diabetes – caracterizado por uma alta nivelção do índice glicêmico – é um distúrbio do metabolismo da glicose, que tem como consequência a sua extensão ao metabolismo de proteínas e de lipídeos. O termo diabetes é originário da Grécia e significa “sifão, lugar por onde passa muito líquido”, fazendo referência à poliúria e à polidipsia, características do diabetes.

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença tão antiga quanto a própria humanidade, uma vez que seus sintomas foram descritos há cerca de 3.500 anos, no Papiro de Ebers no antigo Egito (Marles e Farnsworth, 1995). Hodiernamente, é a mais importante patologia que envolve o pâncreas endócrino. Suas principais manifestações incluem distúrbios metabólicos, que acarretam um estado crônico de hiperglicemia (Ramalho, 1998), sendo a principal causa de cegueira, retinopatia, nefropatia, neuropatia, amputação dos membros inferiores, distúrbios cardiovasculares, hipertensão e infarto do miocárdio. A expectativa de vida em pacientes diabéticos é diminuída à metade, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o número de casos está aumentando significativamente e o tratamento adequado geralmente não está disponível (Marles e Farnsworth, 1995).

O diabetes é um distúrbio crônico multifatorial e tem como forte componente a influência ambiental. As melhorias sócio-econômicas vivenciadas mundialmente nos últimos 20 anos promoveram um aumento significativo no número de casos de diabetes. São previstos 220 milhões de diabéticos em 2010 com um aumento da prevalência da ordem de 25-50% nos próximos 10 anos (Fig. 1). O sedentarismo e a dieta rica em gorduras, características da sociedade moderna, provocam uma maior incidência da obesidade e do diabetes, de tal modo que um

novo termo para a sua designação conjunta, “diabesidade”, está surgindo. O diabetes, portanto, ameaça ser o maior problema econômico-social do século XXI (Zimmet et al., 2001).



**Figura 1.** Mapa de previsão do número de pacientes com diabetes (em milhões) em 2000 e em 2010 (valores superiores e médios, respectivamente) e aumento da porcentagem por país (ZIMMET et al., 2001).

Sendo assim, não é de se estranhar o fato do DM situar-se entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais e que, apesar dos progressos em seu controle clínico, ainda não foi possível controlar de fato suas conseqüências letais. Esta doença é um distúrbio crônico que afeta o metabolismo de carboidratos, de gorduras e proteínas. Um aspecto característico do DM é a hiperglicemia que se estabelece como reflexo da deterioração da utilização dos carboidratos, em virtude de resposta defeituosa ou deficiente à secreção de insulina (Bransome, 1992). Por conseguinte, o DM compreende um grupo heterogêneo de transtornos hiperglicêmicos, que afetam o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas e estão associados a uma deficiência absoluta ou relativa na secreção e/ou ação da insulina (Rao et al., 2001).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization), no ano de 2000 aproximadamente 171 milhões de pessoas possuíam diabetes no mundo e se estima que no ano de 2030 esse número chegue a 366 milhões (World Health Organization, 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA), no ano de 2005 a prevalência do diabetes foi de 20,8 milhões de pessoas, o que corresponde a 7% da população americana sendo que, 14,6 milhões apresentavam diabetes diagnosticado e 6,2 milhões de pessoas possuíam diabetes não-diagnosticado. A incidência de diabetes do tipo 1 entre pessoas menores de 20 anos é entre 1:400 e 1:600, então aproximadamente 176 mil pessoas têm diabetes do tipo 1 nessa faixa etária. O custo anual com a patologia no ano de 2002 nos EUA, atingiu 132 bilhões de dólares, sendo que 92 bilhões foram gastos diretamente e 40 bilhões foram gastos indiretamente (Centers of Disease Control and Prevention, 2005). No Brasil, o último censo nacional realizado foi entre 1986 e 1989, no qual foi constatada uma prevalência do diabetes de 7,6% em pessoas entre 30 e 69 anos de idade.

O número de mortes no ano de 2000, causadas por DM, para a América Latina e Caribe foi igual a 339.035 pessoas, o que representa uma perda de 757.096 anos de vida produtiva entre pessoas com menos de 65 anos e um custo financeiro de mais de três bilhões de dólares. No Brasil, os custos totais estimados para o diabetes, no ano de 2002, foram de 22 milhões de dólares, sendo o custo médio per capita de 872 dólares, o mais alto da América Latina. Gastos médios com pessoas diabéticas alcançam o dobro, ou o triplo, do que com pessoas não afetadas pela doença (Barceló et al., 2003). Esses dados bastariam para justificar a busca de novos compostos eficazes para o tratamento do DM a partir de plantas regionais mais acessíveis a população.

O *Diabetes mellitus* do tipo 1 (DM1) é classificado como deficiência absoluta de insulina resultante da destruição das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. Os critérios para o diagnóstico do diabetes incluem os

sintomas clínicos da doença e dosagem da glicemia casual maior ou igual a 200 mg/dL. Os sintomas clínicos incluem polifagia, poliúria, polidipsia e perda de peso. A glicemia de jejum (pelo menos 8 horas) superior a 126 mg/dL ou glicemia igual ou maior do que 200 mg/dL, verificada 2 horas após a ingestão de 75 gramas de glicose dissolvida em água, são elementos laboratoriais que confirmam o estado diabético (American Diabetes Association, 2007).

O *Diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2), ou não insulino-dependente, e a intolerância à glicose têm se tornado um dos distúrbios mais comuns em clínica médica e estão freqüentemente associados à síndrome metabólica, que se caracteriza por resistência à insulina, obesidade andróide ou central, dislipidemia e hipertensão arterial (Reaven, 1988; Kaplan, 1989). A síndrome metabólica é responsável pela maior morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares tanto em obesos quanto em diabéticos tipo 2.

O tratamento atual do DM2 visa a manter o controle glicêmico adequado, seja com dieta hipocalórica, aumento da prática de exercícios físicos ou uso de medicações. Existem no momento diversas opções terapêuticas, que podem ser utilizadas isoladamente ou em associações, como por exemplo, sensibilizadores da ação da insulina (metformina, tiazolidinedionas), antihiperlipemiantes (acarbose), secretagogos (sulfonilurêias), ativadores de PPAR-gama (glitazonas), drogas antiobesidade e/ou insulina.

Dois hormônios incretínicos identificados como peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) vem sendo estudados para o tratamento do DM2. Ambos os peptídeos são secretados em resposta a ingestão de nutrientes e estimulam a secreção de insulina glicose-dependente (Hinnen et al., 2006). O efeito de incretina, que foi atribuído ao GLP-1 e ao GIP, é reconhecido como uma resposta secretora de insulina significativamente

maior a glicose oral em comparação com glicose intravenosa. Este efeito ajuda a regular os níveis de glicose pós-prandial e é responsável por aproximadamente 60 % da secreção de insulina em resposta a uma carga de glicose oral (Holst e Gromada, 2004).

GIP é um hormônio multifuncional, que também inibe a secreção de glucagon, reduz o esvaziamento gástrico e funciona como um regulador da saciedade (Zander et al. 2002; Deacon et al., 1995). Embora não demonstrado nos seres humanos, estudos experimentais *in vivo* e *in vitro* tem relatado que GIP promove proliferação das células  $\beta$  e reduz a apoptose (Dachicourt et al., 1997; Farilla et al., 2002). Apesar do GIP promover a proliferação e exercer efeitos anti-apoptóticos sobre as células  $\beta$ , seu potencial terapêutico é limitado pela sua meia-vida curta (~2 minutos); ele é degradado rapidamente pela protease endógena, DPP-4 (Kieffer et al., 1995; Mentlein et al., 1993). Por conseguinte, miméticos da incretina, peptídeos que imitam várias das ações glico-regulatórias do GIP, mas são resistentes à degradação pelo DPP-4, continuam a ser investigado para o tratamento de pacientes com DM2. Uma segunda estratégia centrou-se no desenvolvimento de inibidores da enzima DPP-4, que permitem um aumento dos níveis endógenos do GIP (Hinnen et al., 2006; Deacon, 2004).

A Exenatida (Amilina Pharmaceuticals, Inc. e Eli Lilly and Company) é um peptídeo com 39 aminoácidos e atualmente disponível para o tratamento de pacientes com DM2 em muitos países incluindo os Estados Unidos, a União Européia (UE) e partes da América Latina. O medicamento é um composto sintético desenvolvido a partir da saliva do Monstro de Gila, o maior lagarto venenoso dos Estados Unidos, que vive no sudoeste americano e nos desertos do México (Chen e Drucker, 1997). A exenatida é aplicada duas vezes por dia, diariamente (5 ou 10  $\mu$ g) no prazo de 1 hora antes das duas principais refeições do dia (cerca

de 6 horas ou mais afastadas) e tem vários modos de glicoregulação, muitos dos quais são semelhantes ao GIP.

O Diabetes Control and Complications Trial (DCCT, 1996), um estudo prospectivo multicêntrico sobre as diversas formas de tratamento com insulina no DM1 e, mais recentemente, o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS-28/33, 1998), em DM2 tratados com dieta, insulina e/ou hipoglicemiantes orais, mostraram a fundamental importância do controle glicêmico na prevenção ou redução das complicações micro e macrovasculares. O UKPDS demonstrou que o desenvolvimento de complicações microvasculares no DM2 foi reduzido, quer tratado com sulfoniluréia, metformina ou com insulina, mas apenas os pacientes tratados com a metformina apresentaram diminuição significativa das complicações macrovasculares. O UKPDS também mostrou que ocorre uma piora progressiva da função da célula beta pancreática, independente do tipo de tratamento, e que, após nove anos de tratamento, apenas 25% dos diabéticos continuam a responder a monoterapia, sendo necessárias associações de múltiplos recursos para melhor controle glicêmico.

Segundo o American College of Endocrinology (ACE) Consensus Statement on Guidelines for Glycemic Control (2002), o objetivo do controle do diabetes é prevenir as complicações agudas e crônicas da doença, inclusive as macro e microvasculares. Estudos clínicos mostraram que uma redução de 1% no teor de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>), usada como medida do controle glicêmico em longo prazo, reduz as complicações microvasculares em 30% a 35%. Entretanto, os estudos também revelaram que a grande maioria dos portadores de DM2 não consegue atingir metas aceitáveis no que se refere à HbA<sub>1c</sub>.

No ano 2000, dados da National Health and Nutrition Examination Survey mostraram que somente 37% dos participantes tinham atingido níveis de HbA<sub>1c</sub> inferiores a 7% (Saydah et al., 2004). No

ano seguinte, o Colégio Americano de Endocrinologia revisou as recomendações sobre controle glicêmico e abaixou a meta dos níveis de HbA<sub>1c</sub> para 6,5% (AACE, 2002).

## **2.2. Regulação da glicemia**

A glicemia é regulada basicamente através da ação de dois hormônios produzidos nas ilhotas de Langerhans pancreáticas, a insulina e o glucagon, que promovem o ajuste da homeostasia da glicose. Em pessoas saudáveis, a ação do glucagon é a de estimular a produção de glicose pelo fígado e a ação da insulina é a de bloquear essa produção e aumentar a captação da glicose pelos tecidos periféricos insulino-sensíveis, como o músculo esquelético e o tecido adiposo. No estado normal de jejum, pequenos aumentos na glicemia levam a supressão da produção de glucagon e aumento da produção de insulina, enquanto as hipoglicemias levam a um aumento na glucagonemia e redução na insulinemia. A integridade desse sistema é fundamental para a saúde metabólica. No jejum e no estado pré-prandial, o consumo de glicose é representado pelo sistema nervoso central (50%), músculo (25%) e pelos tecidos esplâncnicos (25%) (Dinneen et al., 1992; Gavin III, 2001).

A condição de jejum normal é caracterizada por níveis elevados de glucagon e baixos de insulina, em conjunto com níveis fisiológicos de hormônios gastrointestinais como o polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) e o peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). Tal equilíbrio resulta em uma produção aumentada de glicose pelo fígado e pelo rim, redução na captação periférica de glicose e aumento na proteólise muscular e na lipólise adipocitária. Esse conjunto de ações sincronizadas mantém a glicemia entre 70 e 100 mg/dL, os ácidos graxos livres (produto da lipólise) entre 300 e 400 µmol/L e os triglicérides abaixo de 125 mg/dL. Indivíduos com diabetes tipo 2

apresentam redução na ação e produção de insulina, resultando em aumento na glicemia, ácidos graxos livres, triglicérides e nos aminoácidos no estado de jejum (Gavin III, 2001; Lebovitz, 2001B).

Após uma alimentação balanceada, há um aumento fisiológico normal na glicemia, com incremento de até 50 mg/dL, não ultrapassando 140 mg/dL. Esse aumento depende da quantidade de glicose ingerida e da produção endógena de glicose. Nesse momento, o pâncreas libera uma quantidade maior de insulina, que suprime a produção de glucagon e, conseqüentemente, reduz a gliconeogênese hepática. Concomitantemente, há aumento na captação da glicose pelo músculo e tecido adiposo. Esse processo depende de uma ação eficaz da insulina em seus receptores celulares, e essa resposta metabólica leva também ao retorno dos níveis de lípidos e aminoácidos ao estado basal. Hormônios gastrointestinais como GIP, GLP-1 e PYY3-36 (peptídeo YY3-36) participam desse processo, modulando o apetite, o esvaziamento gástrico, a produção de glucagon e insulina e, eventualmente, até influenciando diretamente a captação de glicose pelos tecidos (Meyer et al., 2004).

### **2.3. Fisiopatologia da hiperglicemia pós-prandial**

A excursão glicêmica normal depende de uma complexa ação de hormônios pancreáticos e gastrointestinais. A hiperglicemia depende da presença de defeitos na produção (redução da secreção insulínica) e na ação da insulina (resistência à insulina). A relativa importância da resistência à insulina nos pacientes diabéticos é sabidamente mais relevante em razão da presença de obesidade e da distribuição centrípeta de gordura, pelo fato de dificultar a ação insulínica por diminuir o número de transportadores de glicose ativos. No entanto, em trabalhos nos quais se fez o ajuste da secreção e ação insulínicas pelo grau e distribuição da adiposidade, a secreção deficitária de insulina

mostrou-se mais importante (Yaney e Corkey, 2003). O tratamento do estado diabético costuma ser mais eficaz quando os dois mecanismos fisiopatológicos são abordados conjuntamente.

A hiperglicemia ocorre pela dificuldade da célula  $\beta$  em compensar a resistência a insulina, com uma resposta secretória deficiente ao estímulo glicêmico. Esse quadro se apresenta tanto no início do processo como também no possível mecanismo de exaustão da célula  $\beta$  inerente à própria evolução da doença. Entretanto, modelos animais com ausência (*knock-out*) de receptor de insulina na célula  $\beta$  pancreática, ou seja, em que há resistência à ação da insulina na própria célula que a produz, apresentam perda da primeira fase de secreção de insulina e têm como achado clínico inicial a hiperglicemia pós-alimentar. Assim, a resistência à insulina demanda uma maior produção de insulina, embora eventualmente culmine com a redução da produção da mesma como no diabetes tipo 2 (Kulkarni et al., 1999).

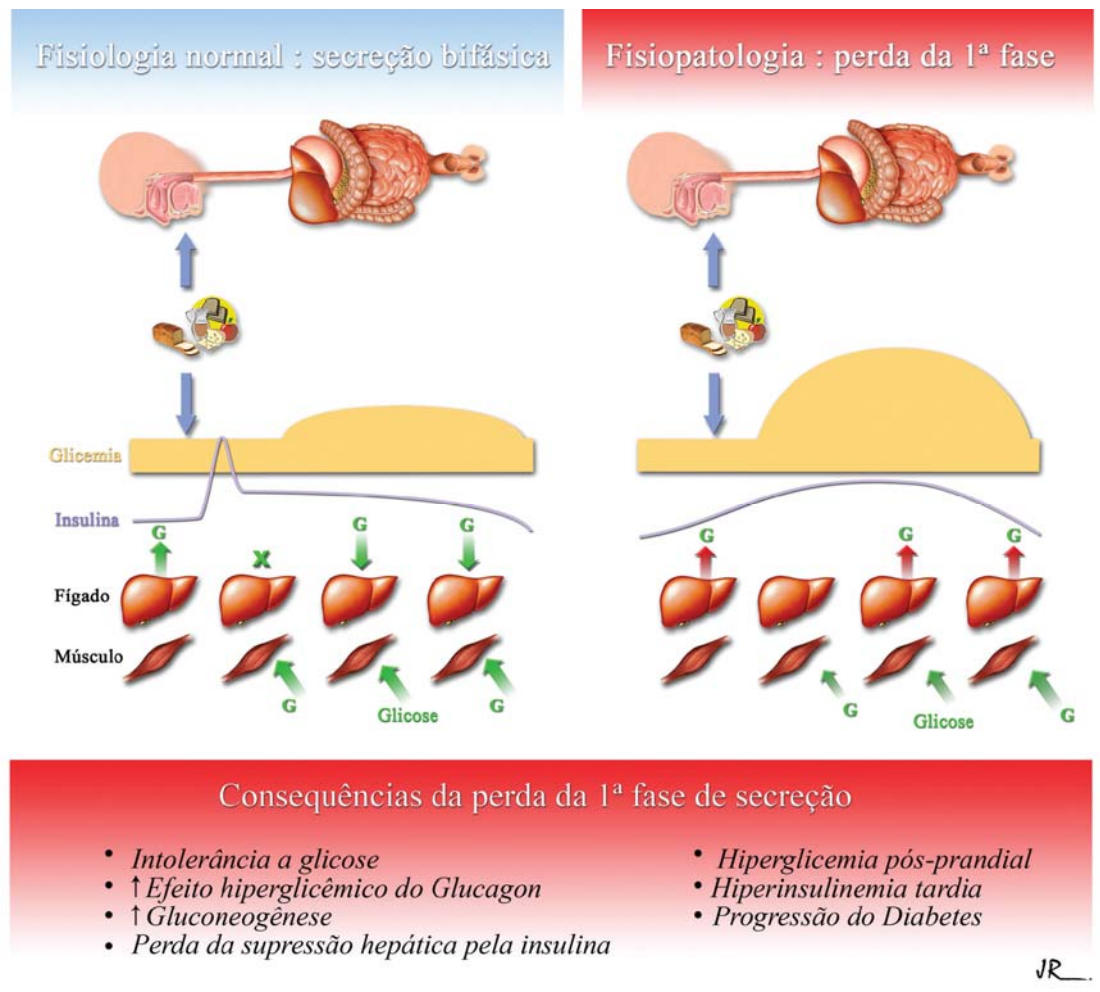
A hiperglicemia pós-prandial crônica pode levar a um estado de glicotoxicidade que se caracteriza pela redução progressiva da secreção pela célula  $\beta$ , ou a perda progressiva da função glicostática do pâncreas, que leva a um agravamento progressivo do estado hiperglicêmico. O caráter tóxico da hiperglicemia sobre a célula  $\beta$  manifesta-se pela redução da expressão do gene de insulina, redução do processamento da pró-insulina e deposição de material amilóide com um aumento do processo de apoptose. Tais mecanismos estão acentuados na concomitância de um aumento da lipemia pós-prandial (triglicérides e ácidos graxos livres) por um mecanismo conhecido como lipotoxicidade (Poitout e Robertson, 2002). Em seguida à ingestão alimentar, alguns hormônios são produzidos e secretados por células intestinais e estimulam a secreção de insulina, sendo conhecidos como incretinas. Há vários hormônios pós-prandiais, os mais importantes são o polipeptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) e o polipeptídeo

semelhante ao glucagon-1 (GLP-1). Realmente, há uma resposta insulínica aumentada à glicose oral quando confrontada à infusão intravenosa de glicose, e esse fenômeno é conhecido como efeito incretina, o qual contribui com 30% a 60% da secreção pós-prandial de insulina. Em pacientes DM2, existe uma discreta redução dos níveis pós-prandiais de GIP e uma intensa redução nos níveis de GLP-1, contribuindo para a insuficiência na secreção insulínica nesses indivíduos (Visboll e Holst, 2004).

O alinhamento entre ingestão alimentar e secreção de insulina é um mecanismo preciso e intrigante. Esse sincronismo é acoplado a uma fase cefálica de secreção de insulina que antecede à ingestão alimentar, sendo pequena em termos absolutos, mas diretamente relacionada à quantidade total de insulina secretada logo após o início da ingestão alimentar (Bruce et al., 1987). Em resposta a uma sobrecarga intravenosa ou oral de glicose existe uma secreção bifásica de insulina, caracterizada por um pico inicial entre cinco e sete minutos. Essa primeira fase de secreção dura até dez ou quinze minutos e é seguida por uma secreção prolongada em níveis mais baixos, usualmente durante até quatro horas, até que o nível de glicose retorne ao valor basal normal. Em termos absolutos, aproximadamente 1% do conteúdo da célula beta é secretado na primeira fase, e mais 10% são secretados na segunda fase (Bruce et al., 1987).

Após uma sobrecarga oral de glicose, existe uma relação inversa entre a concentração de insulina aos trinta minutos (um marcador da primeira fase de secreção) e a glicemia depois de duas horas (Mitrakou et al., 1992). No entanto, existe uma relação direta entre o nível da insulinemia e o da glicemia de duas horas, e a perda da primeira fase de secreção insulínica pode levar a hiperglicemia/hiperinsulinemia tardias. Não havendo o pico inicial de insulina, não há supressão da produção de glucagon e conseqüente bloqueio da produção hepática de

glicose (Luzi e De Fronzo, 1989). A supressão da produção hepática de glicose em indivíduos diabéticos é 50% menor quando comparada a indivíduos normais. Os efeitos da perda da primeira fase estão resumidos na Fig. 2 (Consoli et al., 1989; Del Prato et al., 2002).



**Figura 2** - Efeitos da perda de 1ª fase de secreção: produção hepática de glicose mantida, diminuição da captação periférica da glicose absorvida, resultando em hiperglicemia pós-prandial.

Em indivíduos com DM2 à época do diagnóstico, a primeira fase de secreção está virtualmente perdida apesar de um aumento na segunda fase e da hiperinsulinemia de jejum. Estudo prospectivo com os índios Pima do Arizona, que evoluíram da normalidade ao diabetes

ao longo de cinco anos de acompanhamento, revelou que a passagem do estado normal ao estado de intolerância a glicose e, posteriormente, ao diabetes esteve relacionada ao ganho de peso, à piora da sensibilidade a insulina e à deterioração da primeira fase de secreção de insulina (Weyer et al., 1999). Em resumo, o dano ocorrido na primeira fase é um evento crucial no defeito secretório ligado à origem do diabetes tipo 2, relacionando-se com a intolerância à glicose e com a hiperglicemia pós-prandial (Del Prato et al., 2002).

#### **2.4. Hiperglicemia pós-alimentar e morbimortalidade cardiovascular**

A incidência em ampla escala de doença cardiovascular (DCV) em indivíduos DM2 é reconhecida há muito tempo (Feskens e Kromhout, 1992; Haffner et al., 1998). O risco de instalação de DCV em diabéticos está de duas a quatro vezes aumentado, quando comparados a não-diabéticos. O risco de mortalidade por DCV é duas a dez vezes maior em pacientes diabéticos. Estudo caso-controle avaliando fatores de risco para infarto agudo do miocárdio (IAM), na região metropolitana de São Paulo, mostrou que a presença de antecedentes de diabetes teve associação independente, o que não foi observado em relação à medida glicêmica isolada avaliada no estudo. Interessante observar que apesar de o trabalho não mencionar, pode-se supor que a medida foi feita em jejum, já que na mesma amostra foram avaliados também parâmetros lipídicos (Avezum et al., 2005). Outros trabalhos com a população brasileira mostraram resultados contraditórios (Moraes e De Souza, 1996; Matsubara et al., 1997). A DCV é a principal causa de morte entre indivíduos com diabetes, sendo responsável por até 50% das mortes (Kannel e McGee, 1979; Stamler et al., 1993; Lee et al., 2000). Apesar da hiperglicemia ter se relacionado a maior risco de eventos cardiovasculares no *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS), o tratamento da hiperglicemia não conseguiu reduzir de

maneira significativa o risco de eventos cardiovasculares nesse importante estudo (UKPDS-16, 1995).

Estudos epidemiológicos observacionais têm, no entanto, mostrado que a hiperglicemia pós-prandial é um fator de risco independente para a DCV (Laakso, 1999). A maioria desses estudos foi feita por meio da avaliação da glicemia após o teste oral de tolerância a glicose (TOTG). Apesar de o TOTG não representar o estímulo idêntico ao de uma refeição complexa, com fibras e lipídeos, estudos mostram boa correlação entre os picos glicêmicos observados após o teste e após uma refeição mista, sendo então o TOTG considerado um marcador substitutivo para a glicemia pós-prandial.

Estudos como o *Hoorn Study* (De Veegt et al., 1999), o *Honolulu Heart Study* (Donahue et al., 1987) e o DECODE (*Diabetes Epidemiology: Collaborative Analysis of Diagnostic Criteria in Europe*) Study - 1999) mostraram que a hiperglicemia de duas horas após sobrecarga de glicose foi importante preditor de risco cardiovascular, dado confirmado também por Coutinho e colaboradores, em uma metanálise envolvendo mais de 90 mil indivíduos (Coutinho et al., 1999). Da mesma maneira, estudos de corte prospectivos como o *Whitehall Study*, o *Paris Prospective Study* e o Estudo dos Policiais de Helsinki mostraram que o risco de mortalidade cardiovascular foi duas vezes maior naqueles com resposta hiperglicêmica ao teste de estímulo se comparados àqueles com resposta normal à sobrecarga de glicose (Fuller et al., 1980; Fontbonne et al., 1989; Pyorala, 1979). Assim, ensaios clínicos prospectivos com correção da hiperglicemia pós-prandial poderão caracterizar o real papel desse controle na prevenção de eventos cardiovasculares. Notadamente, a presença de múltiplos fatores de risco associados nos pacientes diabéticos pressupõe uma intervenção terapêutica intensiva nesses pacientes (Bahia et al., 1999).

## **2.5. Os fatores de risco cardiovasculares não- tradicionais e o estado pós-alimentar**

Concentrações plasmáticas elevadas de glicose levam a um aumento da glicosilação não-enzimática de proteínas da membrana celular e de proteínas circulantes. As células permeáveis à glicose (neurônios, retina e células glomerulares) por efeito da hiperglicemia ativam a proteína C quinase (PKC) causando sofrimento celular. Os mecanismos propostos para o dano tecidual da hiperglicemia incluem: ativação da PKC, ativação da via dos polióis correspondendo aos efeitos intracelulares, além de aumento da formação de produtos glicosilados avançados, correspondendo aos efeitos extracelulares da hiperglicemia. O estresse oxidativo aumentado no estado pós-prandial está representado pelo aumento de produtos glico-oxidados e lipo-oxidados no plasma, sendo os produtos glicosilados avançados, espécies altamente reativas. O estresse oxidativo intracelular leva a uma ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis, fator nuclear kB (NFkB) e expressão de fatores de crescimento teciduais (Lebovitz, 2001A).

## **2.6. Estresse oxidativo da parede vascular e a disfunção endotelial pós-prandial**

Por extensão da hiperglicemia pós-prandial existe uma série de acontecimentos que contribuem para o estresse da parede arterial, culminando com um aumento da disfunção endotelial. O estresse oxidativo avaliado pelo aumento sérico de nitrotirosina em associação à presença de produtos avançados de glicosilação, ativação da via dos polióis e aumento da PKC leva ao dano da parede arterial (Lebovitz, 2001A; Haller, 1997).

A função endotelial está distorcida em pacientes com diabetes tipo 2 e manifesta-se pela ativação da PKC, presença aumentada de moléculas de adesão, aumento dos níveis de endotelina (vasoconstritor)

e colágeno tipo IV, além da característica redução da produção do óxido nítrico (NO), importante vasodilatador endotelial.

Em indivíduos diabéticos, a resposta vasodilatadora ao estímulo está alterada e essa alteração relaciona-se com o controle glicêmico. A hiperglicemia induz disfunção endotelial tanto em diabéticos como em não-diabéticos, tendo sido demonstrado aumento da pressão arterial sistólica e diastólica, aumento da frequência cardíaca e diminuição do fluxo sanguíneo nos membros, sugerindo uma vasoconstrição. Essas alterações podem estar relacionadas à menor disponibilidade de óxido nítrico (NO), já que ocorre reversão dos sinais após a infusão de L-arginina, substrato para a NO sintase (Giuliano et al., 1997). Esses processos estão alterados principalmente durante o estado pós-prandial, sendo igualmente influenciados pela presença de hiperglicemia e hiperlipidemia pós-prandiais (Heine e Dekker, 2002; Lee et al., 2002). Alguns dos efeitos provocados pela hiperglicemia foram revertidos com a administração de antioxidantes como glutathione (Marfella et al., 1995), ácido ascórbico (Beckman et al., 2001) e sinvastatina (Ceriello et al., 2004), sustentando o provável papel etiológico do estresse oxidativo na fisiopatologia dessas alterações endoteliais.

## **2.7. Influência da hiperglicemia pós-prandial**

A elevação da glicemia pós-prandial pode estar presente mesmo em condições de glicemia de jejum normal, constituindo um dos estágios iniciais do DM2. Esse estágio contribui para o desenvolvimento das complicações precoces micro e macrovasculares, além de acelerar o processo de progressão para o diabetes sintomático através da glicotoxicidade periférica e também na célula  $\beta$  (Woerle et al., 2004). A caracterização inicial da hiperglicemia pós-prandial e seu controle efetivo constituem um potencial objetivo terapêutico para a prevenção

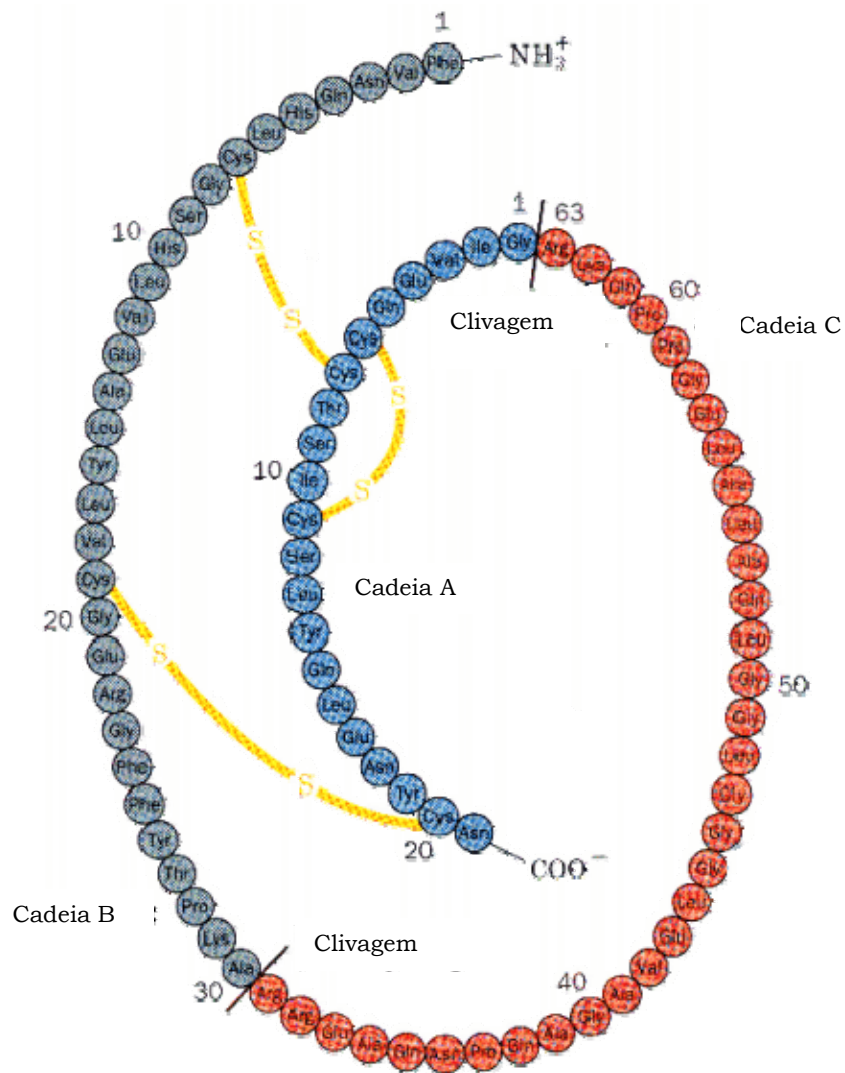
das complicações crônicas do diabetes. De acordo com os consensos mais recentes a glicemia pós-prandial deve ser mantida abaixo de 140 mg/dL para a prevenção das complicações macrovasculares do diabetes, como a doença arterial coronariana (American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for the Management of Diabetes Mellitus, 2002; Consenso Brasileiro sobre Diabetes, 2003).

No estudo prospectivo randomizado de intervenção clínica realizado por De Venciana et al. (1995) em mulheres diabéticas gestacionais, visando a comparar o tratamento do diabetes baseado no controle glicêmico pré-prandial com o pós-prandial, mostraram uma redução do controle glicêmico global, avaliado pela hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>), mais intenso no grupo de controle pós-prandial quando comparado ao pré-prandial (redução de  $3,2 \pm 2,2$  % *versus*  $0,6 \pm 1,6$  %). As crianças nascidas de mulheres controladas no pós-prandial tiveram menores índices de hipoglicemia neonatal e macrossomia, além de implicarem menores índices de indicação de cesarianas por desproporção céfalo-pélvica (De Venciana et al., 1995).

Os procedimentos terapêuticos centrados na redução da glicemia pós-prandial e não na glicemia de jejum parecem ser mais efetivos em promover uma redução mais intensa nos níveis de hemoglobina glicada, reforçando a hipótese da redução da hiperglicemia pós-prandial como principal objetivo para a melhora do controle global e possível redução de complicações macrovasculares (Bastyr et al., 2000). A contribuição relativa da glicemia pós-prandial ou de jejum para o controle glicêmico global parece variar de acordo com o estágio da doença, ou com o grau de controle. Em pacientes com HbA<sub>1c</sub> próxima dos níveis desejáveis, como naqueles indivíduos em fase mais precoce, a glicemia pós-prandial pode responder por até 70% do controle glicêmico global (Monnier et al., 2003).

## 2.8. O Peptídeo C

A mensuração do peptídeo C é usada como forma de avaliação da secreção endógena de insulina. Até recentemente o peptídeo C era visto apenas como uma molécula inativa, com a função de conectar as duas cadeias da pró-insulina, sem qualquer papel direto na regulação do metabolismo (Fig. 3). Novas evidências sugerem que o peptídeo C possa ter algum papel biológico, até mesmo em prevenir ou atenuar algumas das complicações vasculares ou neurais do DM.



**Figura 3.** Estrutura da pró-insulina, mostrando as cadeias A, B e C e os pontos de clivagem para dar origem à insulina e ao peptídeo C. Adaptado de [http://zguw.ibb.waw.pl/~knbm/bmwi/podrek/dna\\_bia/dna\\_bia8.html](http://zguw.ibb.waw.pl/~knbm/bmwi/podrek/dna_bia/dna_bia8.html)

Após a descoberta do peptídeo C, alguns estudos tentaram definir seu papel fisiológico, especialmente no metabolismo da glicose, sem sucesso (Hoogwerf et al., 1986). Foi então instituído que o peptídeo C não apresentava efeitos próprios e não tinha qualquer outro papel a não ser participar da biossíntese de insulina. A importância nessa molécula foi então desviada para a possibilidade de seu uso como um marcador de função da célula  $\beta$  pancreática. Mais recentemente, esses conceitos têm sido revistos, através de novos achados obtidos a partir de estudos com modelos animais e humanos. Possivelmente, a incapacidade de demonstrar os efeitos do peptídeo C no passado se deve, ao menos em parte, à sua saturação de ligação, que ocorre em concentrações ainda fisiológicas. Como consequência, os efeitos mediados pelo peptídeo C são observados em concentração fisiológica ( $0,5$  a  $1,5 \times 10^{-9}$  M) ou abaixo desta, enquanto concentrações suprafisiológicas podem induzir efeitos inespecíficos (Wahren et al., 2004).

O mecanismo de sinalização do peptídeo C envolve ligação com um receptor específico, provavelmente ligado à proteína G, o que provoca ativação de vias de sinalização intracelulares cálcio-dependentes. Isso leva à fosforilação de isoformas específicas da PKC e à ativação do sistema MAP quinase, o que aumenta a atividade de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$  e da óxido nítrico sintase endotelial. Esses receptores específicos foram identificados em células mesangiais e tubulares renais, fibroblastos da pele e células endoteliais da veia safena (Wahren et al., 2004).

No DM, há diminuição da atividade de  $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ , que é associada aos distúrbios de condução nervosa, às alterações da permeabilidade vascular e ao fluxo sanguíneo microvascular (Vague et al., 2004). Essas anormalidades também são associadas à hiperglicemia e participam do desenvolvimento de complicações crônicas do DM.

É possível que o peptídeo C, restaurando a diminuição da atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase, reduza o risco de complicações crônicas do DM. Uma disfunção endotelial com diminuição da atividade da óxido nítrico sintase ou inativação do óxido nítrico também tem sido implicada no desenvolvimento da microangiopatia vascular associada ao DM (Santilli et al., 2004). A atuação do peptídeo C na potencialização da ação da óxido nítrico sintase pode também reduzir o risco de complicações crônicas da doença.

Administrado em doses farmacológicas a ratos com DM, o peptídeo C foi capaz de atenuar o aumento de fluxo sanguíneo induzido pelo DM na úvea anterior, na retina e no nervo ciático (Wahren et al., 2004). O peptídeo C também diminuiu o extravazamento de albumina por meio de vasos sanguíneos nesses tecidos e na aorta, levantando a possibilidade de que este possa prevenir o extravasamento de lipoproteínas aterogênicas em artérias humanas (Wahren et al., 2004). Além disso, aumentou a velocidade de condução nervosa e reduziu alterações degenerativas associadas à neuropatia diabética (Wahren et al., 2004; Sima et al., 2004; Ido et al., 1997).

O peptídeo C mostrou-se também um mitógeno funcional nas células tubulares renais, estimulando significativamente a proliferação celular (Al-Rasheed et al., 2004). Estudos em modelos animais diabéticos tratados com peptídeo C, perceberam alguma redução de hiperfiltração glomerular e da albuminúria, melhora da função renal e reversão de algumas alterações morfológicas associadas à nefropatia diabética (Wahren et al., 2004; Rebsomen et al., 2006; Huang et al., 2002).

Outros estudos indicam que o peptídeo C e a insulina podem interagir sinergicamente nas vias de sinalização da insulina. Existem evidências de que o peptídeo C é capaz de atenuar a atividade da enzima tirosina fosfatase, que influencia a sinalização de insulina por

desfosforilação de seu receptor. O peptídeo C mostrou-se capaz de simular os efeitos da insulina em mioblastos L6 e células de neuroblastoma humano, ativando tanto o receptor de insulina tirosina quinase quanto alguns passos da sinalização da insulina (Grunberger et al., 2001; Li et al., 2003). Apesar disso, estudos em células musculares humanas indicam que o peptídeo C estimula o transporte de glicose sem envolvimento do receptor de insulina ou ativação de tirosina quinase ou fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3 - quinase). Além disso, o peptídeo C aumenta a expressão do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e promove expressão de Bcl2 em células de neuroblastoma (Zierath et al., 1996).

O NF- $\kappa$ B contribui para o desenvolvimento e diferenciação das células nervosas, o que é compatível com efeitos benéficos do peptídeo C na estrutura e na função nervosa no DM (Li et al., 2003).

Considerando todas essas ações, foram iniciados em pacientes com DM estudos clínicos com administração de peptídeo C em associação com insulina.

Em relação ao controle glicêmico, de modo geral, nenhum destes estudos relatou alteração significativa com a administração de peptídeo C (Johansson et al., 1993; Johansson et al., 2000; Wahren et al., 2000). Os efeitos do peptídeo C na utilização de glicose observados em estudos *in vitro* e em modelos animais, provavelmente mediados pelo aumento da produção de óxido nítrico, parecem ser pouco pronunciados em humanos e detectados apenas em estudos com administração de peptídeo C por curtos períodos, mas não em prazos mais longos (Wahren et al., 2000).

Em um estudo duplo-cego randomizado em pacientes jovens com DM1 e nefropatia incipiente, Johansson e seus colaboradores, demonstraram que o uso de insulina juntamente com o peptídeo C

durante quatro semanas reduziu a hiperfiltração glomerular em 6% e a albuminúria em 50%. O uso de insulina isolada não provocou modificações nesses parâmetros (Johansson et al., 1993). A combinação de insulina e peptídeo C por três meses em pacientes com DM1 e nefropatia diabética também levou à queda progressiva e significativa na taxa de excreção de proteína (até 40%), quando comparado ao grupo que recebeu apenas insulina (Johansson et al., 2000).

Em pacientes com DM1 e polineuropatia, Johansson e colaboradores demonstraram melhora da função autonômica (por meio do aumento da variabilidade da frequência cardíaca durante respiração profunda) três horas após a infusão de peptídeo C, sem alterações na função nervosa sensitiva ou motora (Johansson et al., 1996). O mesmo estudo avaliou a função autonômica em pacientes com DM1 após a administração de peptídeo C por três meses, combinado com insulina, observando melhora de 20% na variabilidade da frequência cardíaca durante respiração profunda e melhora da função nervosa sensorial (Johansson et al., 2000). Ekberg e colaboradores (2003) demonstraram uma melhora significativa da velocidade de condução nervosa sensitiva e vibratória em 46 pacientes com DM1, sem sintomas de neuropatia, tratados ao longo de três meses com peptídeo C.

Menos conclusivos são os dados relacionando um possível efeito do peptídeo C na retinopatia em comparação com nefro e neuropatia. Entretanto, a administração de insulina e peptídeo C por um mês a pacientes com DM1 foi associada à diminuição de 30% no extravazamento de fluoresceína por meio da barreira hematoretiniana em comparação com pacientes que receberam apenas insulina (Wahren et al., 2000).

Efeitos benéficos do peptídeo C na microcirculação de pacientes com DM1 também foram relatados, como o aumento do fluxo sanguíneo miocárdico e na função ventricular esquerda, a redistribuição do fluxo

sanguíneo na microcirculação da pele, a melhora da capacidade de difusão capilar e o estímulo da captação de oxigênio no músculo esquelético em pacientes com DM1 (Forst et al., 1998; Fernqvist-Forbes et al., 2001; Hansen et al., 2002). Assim, há evidências de que a administração combinada de insulina e peptídeo C pode ter algum valor terapêutico no tratamento do DM1, para prevenir o desenvolvimento ou retardar a progressão de complicações crônicas da doença.

As células  $\beta$  pancreáticas, além de fabricarem insulina e o peptídeo C, produzem também a amilina, um peptídeo de ação central que modula a função gastrointestinal. De acordo com alguns estudos clínicos, o pramlintide, um análogo da amilina que age sinergicamente com a insulina, melhora o controle metabólico em pacientes com DM1 (Singh-Franco et al., 2007). Contudo, ainda existem muitas questões acerca do uso clínico de outros produtos da célula  $\beta$  além da insulina (pramlintide ou peptídeo C). É importante definir a segurança a longo prazo desses agentes e a relação custo-benefício ao incluir mais drogas no complexo tratamento do DM1.

## **2.9. O Peptídeo insulínotropo glicose-dependente (GIP)**

Após a ingestão de alimentos, a digestão e a absorção dos nutrientes estão associadas a um aumento na secreção de vários peptídeos intestinais, cujas ações se fazem à distância, em locais que promovem a utilização e estocagem da energia. Esses hormônios peptídicos são sintetizados por células enteroendócrinas especializadas, localizadas no epitélio do estômago, intestino delgado e intestino grosso, e são secretadas em baixos níveis basais no estado alimentado (Drucker, 2007).

Os níveis plasmáticos dos hormônios intestinais elevam-se rapidamente alguns minutos após a ingestão de alimentos e, algum tempo depois, diminuem de maneira rápida, principalmente porque eles

são filtrados pelos rins e também são inativados enzimaticamente. Os hormônios intestinais ativam circuitos nervosos de comunicação com tecidos periféricos como o fígado, músculo, tecido adiposo e as ilhotas de Langerhans do pâncreas, coordenando globalmente a quantidade e a assimilação da energia pelo animal. As incretinas, representadas pelos hormônios gastrointestinais, polipeptídeo inibitório gástrico (GIP) e polipeptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1), causam um aumento da quantidade de insulina liberada pelas células beta das ilhotas e têm seus níveis plasmáticos aumentados após as refeições, estimulando assim a liberação de insulina pelas células beta das ilhotas de uma maneira glicose dependente (Drucker, 2006).

Um hormônio intestinal importante é o polipeptídeo insulino-trópico glicose-dependente ou GIP. O GIP é expresso predominantemente no estômago e nas células K na parte proximal do intestino delgado. A secreção do GIP é estimulada pela ingestão de nutrientes e em razão do nutriente absorvido. As gorduras são um potente estimulador em humanos, entretanto, em outras espécies, os carboidratos são secretagogos mais efetivos (Yip et al., 1998).

A ação dominante do GIP é a estimulação da secreção da insulina de forma glicose-dependente. O efeito é mediado através da elevação da concentração intracelular do AMP<sub>c</sub> e da inibição dos canais de potássio ATP dependentes, o que induz a exocitose da célula beta (Gromada et al., 1998). O GIP também promove a biossíntese da insulina e exibe atividade semelhante ao fator de crescimento em células beta *in vitro* durante ativação por AMP<sub>c</sub>/proteína quinase A, MAP quinase-dependente e PI 3 - quinase-dependente (Trümper et al., 2001).

Mais recentemente (Kim et al., 2005) demonstraram que o GIP também ativa vias antiapoptóticas em células da ilhota estudadas *in vitro* e que a contínua infusão de GIP estimulou a sobrevivência de células beta de roedores através da diminuição da expressão da proteína

proapoptótica BAX e do aumento da expressão da proteína antiapoptótica BCL2.

A importância biológica do GIP endógeno no controle da homeostase da glicose é bem determinada quando se experimenta um antagonista do GIP ou uma imunoneutralização da atividade do GIP ou, ainda, ratos desprovidos de receptores para o GIP. A diminuição ou a eliminação da ação do GIP, usando qualquer um dos três procedimentos citados, resulta em uma secreção deficitária de insulina após a administração oral de glicose (Tseng et al., 1996; Miyawaki et al., 1999) o que é consistente com uma função essencial para o peptídeo insulínico glicose-dependente ou peptídeo inibitório gástrico.

A melhor compreensão da biologia da incretina levou à identificação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do DM2, como os inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), os quais, em estudos pré-clínicos, promoveram a proliferação, a neogênese e a inibição da apoptose das células  $\beta$ . (Wajchenberg, 2007; Choy e Lam, 2007). A DPP-4 é uma peptidase plasmática responsável pela meia-vida extremamente curta dos hormônios incretínicos, de tal forma que um efeito terapêutico sustentado das incretinas somente seria possível se as utilizássemos em infusão continuada. Duas estratégias têm sido empregadas no desenvolvimento de uma terapia eficaz baseada nas incretinas: (1) o desenvolvimento de análogos de GIP/GLP-1, resistentes à degradação pela DPP-4 e (2) o desenvolvimento de inibidores de DPP-4, para elevar as concentrações endógenas das incretinas. Entre os análogos podemos mencionar a exenatida e a liraglutida (de administração subcutânea). Entre os inibidores da enzima DPP-4 existem dois tipos de agentes, ambos de administração oral: (1) agentes peptídeo-miméticos, que mimetizam o dipeptídeo N-terminal dos substratos da enzima e (2) inibidores não-peptideomiméticos. Entre os membros do primeiro grupo figuram a vildagliptina e a saxagliptina; entre os membros do segundo grupo, a sitagliptina (Deacon, 2007).

## **2.10. Importância das plantas medicinais**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente três quartos da população mundial usam atualmente ervas e outras formas de medicina tradicional para tratar das doenças, caracterizando então, a medicina alternativa como uma das formas mais comuns de terapia disponíveis às populações de todo mundo, através da utilização das ervas medicinais (Rao et al., 2004).

Aproximadamente 80% das populações dos países em desenvolvimento utilizam a medicina alternativa na solução dos problemas básicos de saúde. Por consequência, várias pesquisas têm foco na avaliação científica de plantas tradicionalmente usadas pelos povos e sua viabilidade terapêutica (Grover e Yadav, 2004).

Em diversos países, situados em regiões tropicais e subtropicais, há muitos recursos herbais que são considerados como alimentos e como auxiliares nos tratamentos de saúde, e acredita-se que os hábitos de consumo destas ervas rendem inúmeros efeitos benéficos à saúde humana (Dubick, 1986).

O homem utiliza as plantas medicinais desde os tempos mais remotos. Há relatos do uso de plantas antidiabéticas na Índia desde o sexto século antes de Cristo (Grover e Vats, 2001), geralmente na forma de chás, obtendo-se um efeito que vem sendo confirmado com o desenvolvimento da pesquisa científica.

As plantas sempre foram usadas como fonte de medicamentos, sendo que cerca de 25% do total de fármacos disponíveis atualmente no mercado são originados das mesmas (Calixto, 2000). Dados etnobotânicos relatam cerca de 800 plantas com potencial anti-diabético, que apresentaram resultados positivos em ensaios experimentais (Grover et al., 2002).

Muitas espécies de plantas são usadas etnofarmacologicamente ou experimentalmente para tratar dos sintomas do diabetes mellitus (Ivorra et al., 1989). Extratos dos frutos de *Momordica charantia* (Cucurbitaceae) têm sido eficientes no tratamento do diabetes tipo 2 (Miura et al., 2004; Senanayake et al., 2004). Os extratos de *Momordica charantia* protegeram os glomérulos dos efeitos prejudiciais do diabetes e impediram o aumento do volume urinário, a excreção de albumina na urina e a hipertrofia renal, assim como causaram redução na taxa de glicose no plasma. O extrato da espécie vegetal continuou a exercer um efeito hipoglicêmico, mesmo quando a maior parte das células beta foi destruída, indicando um efeito insulinomimético direto (Grover et al., 2001). O tratamento realizado com o extrato aquoso liofilizado de *Momordica charantia*, um vegetal comestível, parece ser uma alternativa segura para reduzir os níveis de glicose no sangue (Viridi et al., 2003).

### **2.11. Histórico da *Momordica charantia* L.**

Para o presente experimento, além de sido realizada a coleta de frutos da espécie *M. charantia* nas coordenadas geográficas, latitude 21°09'30,70", longitude 43°12'59,65", em Minas Gerais, foi adquirido da firma norte-americana Raintree Nutrition, Inc, situada em Carson City, NV, fone, (800) 780-5902, endereço eletrônico: [www.rain-tree.com](http://www.rain-tree.com), quatro embalagens de 400 gramas de pó dos frutos de *Momordica charantia*, sendo explicitado em sua embalagem "Bitter melon - Product of Brazil". O produto foi adquirido pelo valor de US\$180,00 sendo retirado em uma farmácia na cidade de New York, por um portador em trânsito entre o Brasil e os E.U.A., sob o argumento da "impossibilidade do envio por FEDEX por se tratar de material não industrializado, que seria então retido na alfândega e que poderia ser enquadrado como biopirataria".

A *Momordica charantia* L. é uma espécie pertencente a família Cucurbitaceae e muitas espécies desta família são comestíveis e reúnem importante valor econômico no Brasil, especialmente aquelas dos gêneros *Cucurbita*, *Momordica*, *Fevillea* e *Sechium*. É uma espécie vegetal silvestre comumente encontrada em áreas urbanas e rurais, sendo conhecida por suas propriedades medicinais (Ribeiro et al., 2004).

A *M. charantia* é uma planta que tem sido freqüentemente utilizada com finalidade medicinal (Giron et al., 1991; Lans e Brown, 1998).

A planta cresce em áreas tropicais na Ásia, na Região Amazônica, no leste da África e nas Ilhas do Caribe. É cultivada em todo o mundo para o uso como planta medicinal (Ahmed et al., 1998). É usada tradicionalmente na medicina caseira em países como Brasil, China, Colômbia, Cuba, Gana, Haiti, Índia, México, Malásia, Nova Zelândia, Nicarágua, Panamá e Peru (Grover e Yadav, 2004). Este vegetal é cultivado também no sul de Kyushu, Japão, devido ao clima subtropical (Senanayake et al., 2004).

O nome latino *Momordica* significa “mordida”, referindo-se às bordas da folha, que parecem terem sido mordidas. É uma planta revolucionária pela sua versatilidade como alimento e em aplicações terapêuticas (Assubaie e El-Garawany, 2004).

A forma de erva daninha pode ter sido trazido junto com sementes de outras culturas e transformaram-se em um problema em plantações por todo o mundo (Robinson e Decker-Walters, 1997). É tolerante a um número variável de ambientes e pode crescer em climas tropicais e subtropicais (Reyes et al. 1993).

É uma planta daninha, trepadeira, bastante freqüente em pomares, cafezais, sobre cercas e alambrados e em terrenos baldios.

Ocorre virtualmente em todas as regiões habitadas do país (Lorenzi, 2000). Os procedimentos para o seu cultivo são similares às do pepino (Reyes et al. 1993).

O fruto imaturo do melão amargo é valorizado pelo seu sabor amargo e é geralmente consumido fresco (inteiro ou em fatias), mas pode também ser feito como pickles, conservado em salmoura. São embalados em caixas com 5 quilogramas do produto e vendidos em Melbourne e em Sydney como uma planta medicinal (Vinning, 1995).

A *Momordica charantia* é um vegetal importante em diversos países, o fruto é rico em vitaminas, principalmente A, B1, B2 e a vitamina-C, que pode ter em torno de 100 mg em 100 g do fruto. O fruto contém também diversos minerais (cálcio, 137,69 mg/100 g de fruto fresco; magnésio, 119,92 mg/100 g de fruto fresco). Parece ser uma fonte boa de ferro, mas o índice de ferro é diretamente associado ao elevado índice de ferro dos solos tropicais. Os níveis de minerais-traço são baixos (cobre, 3,54 mg/100 g; ferro, 5,97 mg/100 g; zinco 3,53 mg/100 g). O fruto contém 93,2% de água. Os ácidos graxos são 0,76% da matéria seca tendo o ácido  $\alpha$ -eleostearico (18:3 9T, 11T, 13C) como o principal ácido graxo na *Momordica charantia*. A análise de aminoácidos mostrou a presença de aminoácidos essenciais em proporções adequadas, exceto a lisina, a cisteína e a metionina (Yuwai et al., 1991).

A *Momordica charantia*, que é o foco do trabalho, é comumente conhecida por melão de São Caetano, erva de lavadeira, fruto de negro, fruta de sabiá, dentre outros. Cultivada em áreas tropicais, especialmente na China, Índia, África, América Central e América do Sul, a planta não tem sua origem perfeitamente conhecida.

Na China, Yang e Walters (1992) agruparam os cultivares de *Momordica charantia* em três tipos hortícolas: 1) fruto pequeno: fruto oblongo, cônico com extremidade final pontiaguda, com 10,0 a 20,0 cm

de comprimento, 5,0 a 8,0 cm de largura, pesando entre 100,0 a 300,0 g e pericarpo com espessura de 0,4 a 0,8 cm. Apresenta superfície verrugosa, verde escura, quando imaturos, e alaranjada, ao viver a maturidade, tendo sabor extremamente amargo e uma deiscência trivalvar quando maduro; 2) fruto longo: o formato é idêntico ao anterior, porém apresenta 30,0 a 60,0 cm de comprimento, 3,5 a 6,0 cm de largura, 200,0 a 600,0 g de peso e pericarpo com espessura entre 0,5 a 0,8 cm. Os frutos maduros são levemente amargos e irregularmente deiscentes; 3) fruto triangular: formato cônico, com 15,0 a 25,0 cm de comprimento, 9,0 a 12,0 cm de largura, 300,0 a 600,0 g de peso e espessura do pericarpo entre 1,0 a 1,5 cm. Os frutos maduros têm um sabor de médio a fortemente amargo e exibem deiscência irregular.

Os frutos exibem sementes vermelhas e brilhantes em função de um índice elevado de licopeno, podendo ser usado como corante natural em alimentos. Por muito tempo foi utilizado na medicina tradicional para muitos tratamentos (Assubaie, 2004).

O licopeno possui propriedades antioxidantes e atua protegendo as células humanas do estresse oxidativo produzido pela ação dos radicais livres, que são um dos principais responsáveis pelas enfermidades cardiovasculares, pelo câncer e pelo envelhecimento. Age modulando as moléculas responsáveis pela regulação do ciclo celular e produzindo uma regressão de certas lesões cancerosas. Não se conhece exatamente as bases biológicas e físico-químicas destas propriedades, porém parecem diretamente relacionadas com o elevado poder antioxidante do licopeno, muito mais do que outros antioxidantes como a vitamina E e o  $\beta$ -caroteno. Um grande número de processos cancerígenos e degenerativos estão associados a danos oxidativos sobre o genoma e os mecanismos genéticos de controle da proliferação e diferenciação celular. O licopeno atuaria como um potente neutralizador

de radicais livres (superóxido e peróxido) atenuando os danos oxidativos sobre os tecidos (Gester, 1997).

Há vários princípios ativos já conhecidos, dentre eles o alcalóide mormodicina, a mormodipicrina, o ácido mormódico (Correa, 1984) e a charantina, uma mistura de glicosídeos, principalmente *β-sitosterol-D-glicosídeo* e o *5,25-estigmastadieno-3-β-ol-D-glicosídeo*, estes com acentuada ação antioxidante (Marles e Farnsworth, 1995).

A administração oral do extrato cetônico do pó do fruto por 15 a 30 dias em ratos aloxonizados reduziu a glicemia e a colesterolemia aos níveis normais mesmo após 15 dias de descontinuação do tratamento (Grover et al., 2002).

Estudos em animais têm mostrado, diversamente, que o melão de São Caetano inibe a absorção de glicose, promove a utilização de glicose pelo fígado, contém um peptídeo semelhante à insulina, aumenta a secreção pancreática de insulina e aumenta a produção de células beta no pâncreas. Entretanto, um aumento dos níveis plasmáticos de insulina não tem sido observado e o exato mecanismo pelo qual a glicemia é afetada, permanece desconhecido. De forma global, os estudos desenvolvidos em animais e as observações coletadas pela etnofarmacologia, sugerem que, de alguma maneira, o melão de São Caetano tem importante papel no tratamento do Diabetes mellitus tipo 2 (Abascal e Yarnell, 2005).

No Brasil, o melão de São Caetano é abundante e muito usado na medicina popular, especialmente nordestina. Entretanto, tem sua composição química e propriedades farmacológicas pouco estudadas no Brasil, ainda que a planta nos últimos 25 anos tenha recebido uma maior atenção dos pesquisadores orientais, devido à descoberta da presença em suas sementes da *Triconsantina*, uma substância protéica inativadora de ribossomos e com atividade imunossupressora (Lorenzi, 2000).

Apesar dos fármacos atualmente utilizados no tratamento do DM apresentarem efeitos eficazes no controle da glicemia, nenhum deles aborda a preservação/regeneração das células beta das ilhotas de Langerhans e a caracterização de um princípio ativo vegetal que venha a exercer um efeito protetor direto ou indireto sobre as células produtoras do hormônio insulina, poderia representar uma nova classe de medicamentos e enormes benefícios para a população.

## **2.12. Indução do Diabetes mellitus**

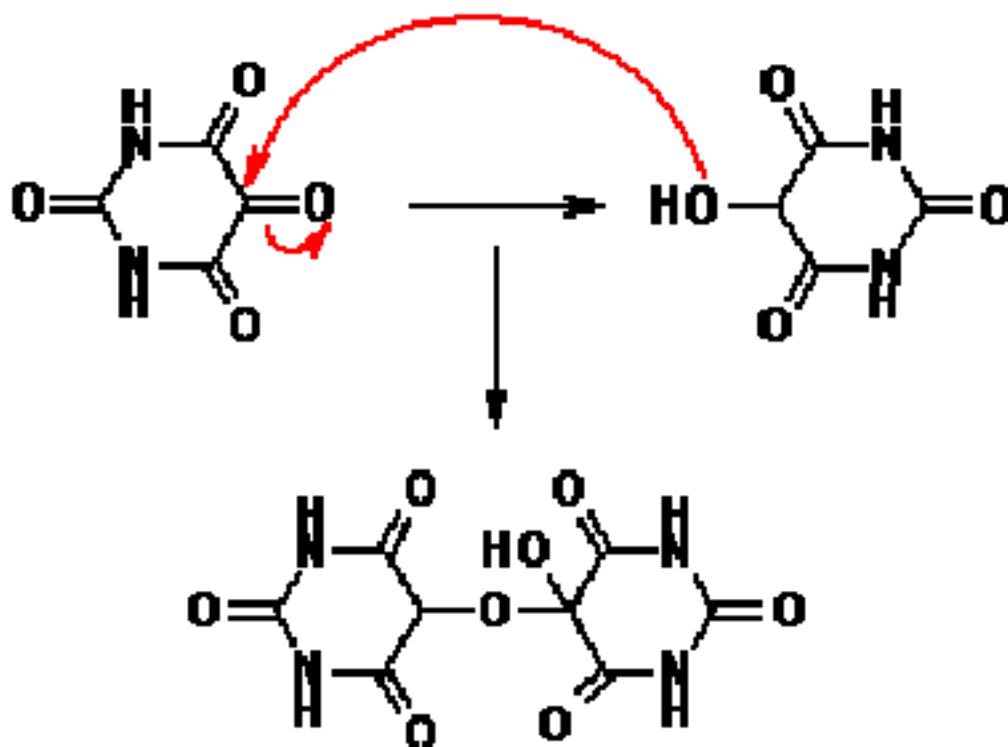
Os modelos mais utilizados *in vivo* para o estudo do diabetes são roedores tratados com aloxano ou estreptozotocinas (STZ) (Marles e Farnsworth, 1995), também conhecida como estreptozocina. A STZ é um glicosídeo nitrosouréa natural isolado do *Streptomyces achromogenes* e estimula a produção de radicais livres, o que leva à destruição e à disfunção das células beta das ilhotas de Langerhans. Este xenobiótico tem sido usado para induzir o diabetes com concomitante deficiência de insulina. Uma dose simples em ratos pode produzir um modelo experimental do diabetes. Entretanto, seu alto poder carcinogênico leva a formação de insulinoma, o que impede a manutenção da hiperglicemia nos animais experimentais (Marles e Farnsworth, 1995).

O aloxano foi originalmente isolado em 1818, por Brugnatelli, e recebeu este nome em 1838, por Friedrich Wöhler e Justus Von Liebig. O termo aloxano surgiu por mistura das palavras alantoína e ácido oxalúrico (Lenzen e Panten, 1988).

O aloxano, um derivado da pirimidina, é muito seletivo para células beta pancreáticas. No entanto, apesar de ser um bom indutor para o *Diabetes mellitus*, apresenta problemas devido à sua instabilidade química, metabolismo rápido e alguns fatores, tais como a idade e a dieta do animal, que exigem cautela quando se deseja estabelecer uma

relação clara entre as doses de aloxano e sua concentração efetiva no pâncreas (Marles e Farnsworth, 1995).

O aloxano é um análogo tóxico da glicose que destrói seletivamente as células produtoras de insulina do pâncreas quando administrado a roedores e muitas outras espécies animais. Ele causa diabetes mellitus insulino-dependente (chamada Diabetes Aloxâmica) nesses animais, com características similares ao diabetes tipo 1 em humanos. O aloxano é seletivamente tóxico para as células  $\beta$  produtoras de insulina porque se acumula nas células através de seu acesso facilitado pelo transportador de glicose GLUT 2. Na presença de tióis intracelulares, o aloxano gera espécies reativas de oxigênio (EROS) em uma reação cíclica com o produto de sua redução, o ácido dialúrico (Fig. 4). A ação tóxica do aloxano na célula  $\beta$  é iniciada pelos radicais livres formados na reação de redox com os tióis intracelulares. O aloxano não causa diabetes em humanos (Lenzen e Panten, 1988).



**Figura 4:** aloxano (esquerda) com o ácido dialúrico (direita) e a aloxantina (centro) (Lenzen e Panten, 1988).

O aloxano possui um efeito seletivamente tóxico sobre as células  $\beta$  das ilhotas de Langerhans (Mrozikiewicz et al., 1994). Lenzen e Panten (1988) citam em seus estudos que no modelo experimental de diabetes aloxânico, os animais apresentam sintomas semelhantes aos encontrados no *Diabetes mellitus* em humanos, tais como perda de peso corporal, polidipsia, poliúria, glicosúria, cetonúria, hiperglicemia e cetonemia. Embora os mecanismos pelos quais isso ocorre não sejam totalmente conhecidos, acredita-se que haja envolvimento de reações mediadas por radicais livres que, como se sabe, danificam as células e provocam a ocorrência de doenças auto-imunes (Mrozikiewicz et al., 1994).

Kronenberg (2007) afirma que nos animais segundo os quais são aplicadas doses de aloxano, há a presença de três fases com relação aos níveis glicêmicos: 1ª) hiperglicemia imediata devido, provavelmente, à

glicogenólise hepática; 2ª) hipoglicemia resultante da liberação da insulina pelas células beta destruídas; 3ª) hiperglicemia devido à deficiência de insulina.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar em ratas com diabetes aloxâmica se a melhora no controle glicêmico promovida pela ingestão da infusão de frutos do melão de São Caetano (*Momordica charantia*) está relacionada com o aumento na secreção/eficiência do hormônio incretínico GIP. Investigar também a capacidade desse agente na preservação ou melhora da função e/ou da massa de células beta pancreáticas. Além disso, o estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de um fármaco para ampliar a ação das incretinas, constituindo-se em uma alternativa terapêutica importante para o diabetes.

#### **3.2. Objetivos específicos**

a) Formar um grupo de ratas wistar portadoras de diabetes aloxâmica, mantendo-as em condições de atender ao previsto no experimento, pelo prazo de 25 dias;

b) estabelecer parâmetros de normalidade em ratas para concentrações plasmáticas de:

b.1. glicemia casual;

b.2. peptídeo de ligação da insulina (Peptídeo C);

b.3. peptídeo inibitório gástrico ou peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP);

b.4. insulina e

b.5. hemoglobina glicada após 25 dias de diabetes severa e/ou moderada.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material botânico**

Os frutos de *Momordica charantia* foram coletados durante o mês de fevereiro de 2008, na cidade de Silverânia, MG, no sítio Paraíso, latitude 21°09'30,70", longitude 43°12'59,65". A exsicata do material coletado foi identificada por Marco Locarno, Engenheiro Agrônomo do Instituto de Biociências da Universidade Presidente Antônio Carlos, em Barbacena, MG e foi depositada no Herbário VIC, da Universidade Federal de Viçosa, MG, com a identificação número 31.825. Os frutos frescos foram picados e secos em estufa a 40°C por sete dias. Após a secagem, os frutos foram pulverizados em moinho de Wiley e armazenados a temperaturas entre 4°C e 8°C.

### **4.2. Preparação da infusão**

Para a obtenção de infusão semelhante à adotada pela medicina popular, adotou-se o método extrativo vertendo 60 mL de água destilada aquecida a 80°C, em um erlenmeyer contendo 6 gramas do pó de frutos de *Momordica charantia*, agitando e deixando a seguir em repouso sob abafamento por 10 minutos. O extrato bruto foi então filtrado e resfriado em temperatura ambiente até 35°C. A infusão foi preparada diariamente, no mesmo horário.

### **4.3. Animais**

Foram utilizadas 42 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), com as seguintes características: fêmeas, adultas jovens de aproximadamente 50 dias, sadias, da linhagem Wistar, pesando entre 180 e 250 gramas, oriundas do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, MG.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Presidente Antônio Carlos – UNIPAC, através do parecer nº 227/07.

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais, com bebedouros de 250 mL e mantidos no biotério da Faculdade de Medicina de Barbacena, em gabinete da marca Insight, modelo EB 273, tendo o fotoperíodo ajustado para 12 horas de claro e escuro, temperatura variando entre 24°C e 26°C, a umidade relativa do ar entre 50% e 65% e o fluxo de ar programado para evitar acúmulo de gases metabólicos tóxicos. A dieta normocalórica (Controle) consistiu de ração comercial para ratos (Nuvilab<sup>®</sup>), contendo por peso: 19,0% de proteína, 56,0% de carboidrato, 3,5% de lipídeos, 4,5% de celulose, 5,0% de vitaminas e minerais, e assim como a hídrica foi fornecida *ad libitum*, sendo o consumo de água e de ração verificado e anotado, para reposição diária.

#### **4.4. Indução do *Diabetes mellitus* experimental**

O diabetes experimental foi induzido pela administração de aloxano (5,6-Dioxiuracil monohidrato) – Alloxan monohydrate, SIGMA-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA, diluído a 2% em solução de citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5. A droga foi administrada por via intraperitoneal, em doses de 75 mg/kg de peso corporal, após jejum alimentar de 48 horas, com fornecimento de água “*ad libitum*”. Seis horas após a indução e ainda em jejum completo, os animais receberam uma solução de glicose a 10% como única fonte hídrica por 24 horas, momento no qual foi liberada a alimentação normal.

#### **4.5. Seleção, distribuição e tratamento dos animais**

Do total de 42 animais da amostra inicial, foram aleatoriamente escolhidos 14 dentre eles para formar o grupo controle sadio sem nenhum tratamento (7 animais) e o grupo sadio tratado com a infusão de *Momordica charantia* (7 animais). Dos 28 animais restantes, 25 foram aloxano-induzidos como descrito anteriormente e classificados como grupo teste. No sexto dia após a indução, foi determinada a glicemia casual dos três grupos. Todos os animais do grupo teste que apresentaram glicemia casual acima de 180 mg/dL, foram considerados diabéticos, sendo os demais desprezados.

Os animais considerados diabéticos foram então distribuídos em dois grupos, identificados como grupo 1 (diabéticos tratados) e grupo 2 (diabéticos não-tratados). Foram formados também os grupos 3 (controle) e o grupo 4 (sadio tratado com *Momordica charantia*). Os grupos 1 (8 animais) e 4 (7 animais) receberam diariamente, no mesmo horário, por um período de 25 dias e através da técnica de gavagem, 1 mL/250g de peso corporal da infusão preparada conforme citado anteriormente. Os animais dos grupos 2 (7 animais) e 3 (7 animais) receberam apenas soro fisiológico.

#### **4.6. Determinação do peso, da ingestão alimentar e hídrica.**

Para permitir o acompanhamento da evolução clínica dos animais, seus pesos foram verificados nos dias 1, 11 e 25 do experimento, com a sedação do animal por inalação de éter etílico, evitando assim muita mobilidade no prato da balança. Foram oferecidos 100 g de ração, verificando-se o consumo por diferença entre a oferta e a ração coletada da gaiola individual e pesada quando da visita de verificação diária do andamento do experimento. A água foi oferecida em bebedouros de 250 mL, com dispositivo conta-gotas automático sendo o consumo de água

verificado por diferença entre a oferta inicial e a observação final, e o volume consumido medido em proveta de 250 mL.

#### **4.7. Dosagem da glicemia casual e hemoglobina glicada**

A glicemia casual foi medida no 6º dia após a indução por aloxano, com sangue retirado de uma veia da face interior da pata posterior do animal e no 25º dia do experimento, no momento da coleta de material histo-patológico, com sangue coletado no ventrículo esquerdo do animal. As glicemias casuais foram determinadas em glicosímetro Prestige IQ n° série 7994403, usando fitas código 21-IBR712A1.

A obtenção de sangue total para a determinação de hemoglobina glicada foi realizada no momento da cirurgia para coleta de pâncreas e fígado dos animais. O sangue foi retirado através de seringas descartáveis contendo EDTA e acondicionado em tubos adequados, identificados e imediatamente armazenados a 4°C. Foi utilizado o método Liquidirect da Invitro Diagnóstica S/A .

#### **4.8. Dosagens imunoenzimáticas**

O sangue, coletado em seringa banhada em EDTA, foi cuidadosamente transferido para um tubo de ensaio também com EDTA, ao qual foi acrescentado sitagliptina na proporção de 10 µL/mL de sangue. Em seguida, foi centrifugado e o plasma separado em alíquotas de 500 µL destinadas aos ensaios imunoenzimáticos.

Os ensaios imunoenzimáticos foram realizados usando-se kits da Linco Research (Rat/Mouse insulina ELISA kit, cat. #EZRMI-13K, Human GIP (total) ELISA kit, cat. #EZHGIP-54K) e da Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-América) para a determinação do peptídeo C (kit

IB79101). A leitora ELISA utilizada foi a ELx800 da Biotek Instruments Inc, sendo os testes realizados em duplicata.

#### **4.9. Tratamento estatístico**

O método da análise de variância - ANOVA, com uma fonte de variação (grupo de tratamento), foi o utilizado, seguido por múltipla comparação pelo teste de Scott-Knott, com nível de significância pré-estabelecido de 5%. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Método de indução**

O rato wistar, por apresentar vantagens em relação a outros animais de maior porte e, principalmente, por se assemelhar clínica, laboratorial e histopatologicamente ao diabetes humano (Lerco et al. (2003), foi o escolhido para compor o modelo experimental.

O aloxano foi preferido como droga diabetogênica, em função dos efeitos produzidos pela sua administração serem semelhantes àqueles encontrados na síndrome diabética em humanos: hiperglicemia, polifagia, polidipsia, poliúria, entre outros. O aloxano é um análogo tóxico da glicose, que destrói seletivamente as células produtoras de insulina do pâncreas quando administrado a roedores e a muitas outras espécies animais. Ele causa Diabetes mellitus insulino-dependente (chamada Diabetes Aloxâmica) nesses animais, com características similares a diabetes tipo 1 em humanos. O aloxano é seletivamente tóxico para as células  $\beta$  produtoras de insulina porque se acumula nas células através de seu acesso facilitado pelo transportador de glicose GLUT 2. O aloxano, na presença de tióis intracelulares, gera espécies reativas de oxigênio (EROS) em uma reação cíclica com o produto de sua redução, o ácido dialúrico. A ação tóxica do aloxano na célula  $\beta$  é iniciada pelos radicais livres formados na reação de redox com os tióis intracelulares. O aloxano não causa diabetes em humanos (Lenzen, 2008).

O aloxano é um dos agentes diabetogênicos mais estudados e comumente utilizados no meio científico para a indução de diabetes experimental. Possui citotoxicidade específica para as células beta pancreáticas, causando insuficiência insulínica primária do pâncreas e provocando uma resposta trifásica nos níveis glicêmicos durante as

primeiras horas de administração, seguida do estabelecimento de diabetes permanente nas 24 horas subseqüentes (Lerco et al., 2003).

Zanoello et al. (2002) concluiu que a citotoxicidade seletiva do aloxano é função da grande capacidade da célula beta em acumular a droga, aliada à característica de maior sensibilidade desta célula a espécies reativas de oxigênio, quando comparada a outros tecidos.

O aloxano administrado por via intraperitoneal, na dose de 75 mg/kg de peso corporal, produziu nos animais utilizados no presente experimento, diabetes moderado e severo, com o desenvolvimento de alterações clínicas e laboratoriais, incluindo, respectivamente, elevação da ingestão alimentar e hídrica e valores para a glicemia casual situados entre 180 a 590 mg/dL.

No presente estudo, dos 25 animais submetidos à aplicação intraperitoneal de aloxano, 18 ratas (72%) não ficaram diabéticas ou apresentaram diabetes leve, um animal morreu minutos após a indução, provavelmente por resposta vaso-vagal exagerada e 6 ratas (24%) desenvolveram diabetes severo. Após uma nova indução com a dose padrão de aloxano pela mesma via, das 18 ratas reinduzidas, 6 ratas (33%) desenvolveram diabetes segundo o critério estabelecido (glicemia casual  $\geq$  180 mg/dL) e dois animais evoluíram ao óbito. Promoveu-se nova reindução nas 10 ratas remanescentes obtendo-se agora 3 ratas (30%) diabéticas e 7 ratas com intolerância à glicose (glicemia entre 100 mg/dL e 125 mg/dl).

Esses resultados apresentados, ou seja, 60,0% de animais diabéticos moderados e severos, 28,0% de ratas não-diabéticas e 12,0% de taxa de mortalidade, foram considerados satisfatórios no que diz respeito à taxa de mortalidade e à taxa de indução bem sucedida. O resultado satisfatório é embasado na comparação com os trabalhos que promovem o diabetes experimental por aplicação endovenosa do aloxano

a 2% (na dose única de 42 mg/kg de peso corporal, após um jejum de 12 horas), nos quais se relata uma taxa de mortalidade de 33 a 60% e uma taxa de indução bem sucedida de 39 a 50%.

Lukens (1948), revisando o trabalho de vários autores, cita que animais que não respondem a uma primeira administração de aloxano, podem ser refratários a injeções posteriores de doses similares. Entretanto, esses mesmos animais, refratários às doses subseqüentes, tornam-se diabéticos após 60 horas de jejum, com uma dose padrão de aloxano.

O protocolo de indução foi pela via intraperitoneal e após um período de jejum sólido de 48 horas, pois, segundo Lukens (1948) *apud* Lerco et al. (2003), o jejum tem um papel importante na resposta dos animais à injeção de aloxano. Os autores relatam que, em alguns casos, 95% dos animais que recebem o aloxano em estado de jejum prolongado de 48 a 60 horas, tornam-se diabéticos, enquanto que, sem o jejum, a administração de dose similar de aloxano, diminui essa resposta para 25%.

Outro fator aplicado foi a diluição do aloxano em solução de citrato de sódio 0,05 M, pH 4,5, que mantém o aloxano em sua forma protonada, evitando a sua rápida hidratação quando em solução, o que, de acordo com Presta e Pereira (1987), poderia prejudicar o seu efeito indutor de diabetes.

A oferta de glicose a 10% como única fonte hídrica por 24 horas e após as primeiras 6 horas de indução é, segundo Mazzanti et al. (2003), fundamental para evitar uma hipoglicemia fatal, devido à liberação maciça de insulina decorrente da destruição das células beta pancreáticas.

Lukens (1948) relata índices muito variáveis de mortalidade podendo chegar a 100% na mesma espécie. Isso se deve a múltiplos fatores capazes de modificar os efeitos da droga e a sensibilidade do hospedeiro, envolvendo desde o estado de hidratação da droga, a dose administrada, a velocidade de infusão, a via de administração, a dieta, o tempo de jejum até o peso do animal.

Os resultados de nosso experimento permitem afirmar que a dose aplicada, o jejum prolongado antes da indução, a administração da solução de glicose a 10% nas 24 horas após a indução, o pH ácido da solução de aloxano e a via intraperitoneal contribuíram significativamente para a obtenção de um alto índice (60,0%) de animais diabéticos, associado a um baixo índice (12,0%) de mortalidade.

## **5.2. Evolução clínica**

Os parâmetros clínicos avaliados foram o peso inicial e final dos animais, o consumo alimentar e hídrico durante o experimento, a diurese e o estado geral dos animais.

Os animais do Grupo Controle Normal e do Grupo Sadio Tratado com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* não mostraram alterações clínicas durante as avaliações semanais previstas para o experimento e os parâmetros clínicos observados mantiveram-se dentro dos níveis esperados para ratas sadias da mesma idade.

Os animais integrantes do Grupo Diabético e do Grupo Diabético Tratado com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* evoluíram com alterações clínicas compatíveis com a patologia, tais como polifagia, polidipsia e poliúria.

No Grupo Controle Normal, os animais mantiveram-se em bom estado geral, ativos, com apetite normal, tônus e reflexos conservados e

com um pequeno ganho de peso. A ingestão hídrica e alimentar, e também a diurese, situaram-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie e em consonância com outros trabalhos (Brekke et al., 1981).

No Grupo Diabético os animais apresentaram polifagia, polidipsia e poliúria, compatíveis com diabetes grave. A medida da ingestão alimentar, obtida por diferença entre a pesagem do alimento oferecido e o alimento restante na gaiola ao final de 24 horas, foi maior no Grupo Diabético (22,82 g/dia) e no Grupo Diabético Tratado (23,58 g/dia), quando comparados com o Grupo Controle Sadio (17,84 g/dia) e o Grupo Sadio Tratado (16,28 g/dia), com diferenças significantes ( $P < 0,05$ ) entre os grupos diabéticos e os grupos sadios.

De igual forma, a ingestão hídrica dos animais diabéticos mostrou valores significativamente elevados quando comparados com os animais do grupo sadio, da mesma idade e espécie. A tabela comparativa dos consumos alimentar e hídrico dos animais é mostrada a seguir.

**Tabela 1.** Médias de consumo alimentar e hídrico após vinte e cinco dias de experimento.

| Grupos                  | Consumo alimentar (g) | Consumo hídrico (mL)  |
|-------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Controle Sadio (n=7)    | 17,84 ± 0,95 g (a)    | 41,54 ± 4,66 mL (a)   |
| Sadio Tratado (n=7)     | 16,28 ± 0,71 g (a)    | 41,68 ± 2,90 mL (a)   |
| Diabético (n=7)         | 22,82 ± 2,10 g (b)    | 83,49 ± 16,81 mL (b)  |
| Diabético tratado (n=8) | 23,58 ± 2,59 g (b)    | 107,52 ± 19,67 mL (b) |

Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM); médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) entre si.

A elevação da concentração de glicose no filtrado glomerular, ultrapassando a capacidade reabsortiva das células tubulares renais, é o que explica a forte diurese dos animais diabéticos. Tal concentração de

glicose provoca um efeito osmótico na direção do filtrado, sendo responsável pela grande produção de urina, acompanhada de aumento da osmolaridade sanguínea, agravada pelas altas taxas de glicemia. Isso provoca a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular com o objetivo de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é então percebida pelos osmorreceptores cerebrais, desencadeando a sede intensa.

A lipólise provocada pela ausência da insulina provoca, a médio prazo, perda de peso, fadiga e fraqueza, induzindo então o animal a ingerir mais alimento, caracterizando então a polifagia mostrada na tabela 1.

Na observação do valor médio do peso corporal dos animais (tabela 2), verificou-se um aumento de peso em todos os grupos de tratamento, com aumento percentual maior (5,72%) no grupo Sadio Tratado com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia*. A menor variação percentual ocorreu no Grupo Controle Sadio (1,12%). Nos Grupos Diabético e Diabético Tratado, o Grupo Diabético apresentou um ganho de peso de 4,14% e no Grupo Diabético Tratado com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia*, o ganho de peso foi de 3,43%, todos ao longo dos 25 dias do tratamento.

**Tabela 2.** Médias do peso corporal antes e após 25 dias de experimento.

| Grupos                  | Peso inicial (g) | Peso final (g) | Variação(%) |
|-------------------------|------------------|----------------|-------------|
| Controle Sadio (n=7)    | 215,71 ± 7,51    | 218,14 ± 10,16 | 1,12        |
| Sadio Tratado (n=7)     | 222,14 ± 4,11    | 234,85 ± 5,61  | 5,72        |
| Diabético (n=7)         | 213,71 ± 4,12    | 222,57 ± 7,11  | 4,14        |
| Diabético tratado (n=8) | 214,75 ± 7,31    | 222,12 ± 11,81 | 3,43        |

Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM).

Constatou-se que a grande variação no erro padrão da média (EPM) relacionada ao peso corporal das ratas diabéticas está fortemente ligada aos seus níveis glicêmicos mantidos durante o experimento. Os animais que mantiveram glicemias superiores a 325 mg/dL durante o experimento perderam peso, enquanto os animais que mantiveram glicemias menores que 325 mg/dL ganharam peso. Essa variação glicêmica, combinada com o pequeno número de animais por grupo do experimento, levou a grande variação do EPM e está em consonância com os resultados de Cavalli et al., (2007). Os grupos de tratamento não mostraram diferenças significantes entre si (teste de Scott-Knott).

### 5.3. Evolução laboratorial

#### 5.3.1. Glicemia e hemoglobina glicada

A glicemia dos animais dos grupos estudados encontra-se representada na tabela 3. Os resultados indicam aumento significativo ( $P < 0,05$ ) da glicemia casual entre os grupos Controle Sadio/Controle Tratado e os grupos Diabético/Diabético Tratado, caracterizando o Diabetes mellitus.

**Tabela 3.** Médias glicêmicas antes e após 25 dias de experimento.

| Grupo                 | Glicemia casual<br>(mg/dL) | Glicemia casual<br>(mg/dL) | Variação da<br>glicemia (%) |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Controle sadio (7)    | 115,1 ± 3,4 (a)            | 126,6 ± 8,7 (a)            | (+) 10,1                    |
| Sadio tratado (7)     | 115,8 ± 2,9 (a)            | 115,3 ± 4,7 (a)            | (-) 0,38                    |
| Diabético (7)         | 348,1 ± 38,3 (b)           | 317,3 ± 57,7 (b)           | (-) 7,40                    |
| Diabético tratado (8) | 460,9 ± 25,2 (c)           | 381,0 ± 66,3 (b)           | (-) 12,4                    |

Valores expressos representam as médias ± erro padrão da média (EPM); médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) entre si.

Os valores encontrados para a glicemia casual do grupo Controle Sadio, realizados no 6° e 25° dia do experimento, são compatíveis com animais normoglicêmicos. Glicemias de jejum em ratos wistar, segundo Zanoello et al., (2002), variam entre 47,7 a 107 mg/dL. Em humanos, a glicemia casual (avaliada a qualquer momento) pode assumir valores até 200 mg/dL, sem que caracterize diabetes mellitus, desde que não esteja acompanhada de sinais clínicos.

Os animais do Grupo Controle Sadio apresentaram um aumento de 10,1% nos níveis glicêmicos casuais, resultados compatíveis com a casualidade das dosagens e da ingestão alimentar.

Em contraste, o Grupo Sadio Tratado apresentou médias glicêmicas menores que o Grupo Controle Sadio e verificou-se uma redução média de 0,38% nos índices de glicemia. Comparando-se os dois grupos, pode-se concluir que o tratamento do grupo sadio com a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* pode ter interferido na detecção de níveis glicêmicos médios menores quando comparado com o Grupo Controle Sadio (aumento de 10,1%), confirmando o caráter hipoglicêmico da espécie vegetal, o que está em acordo com diversos autores (Miura et al., 2004; Senanayake et al., 2004; Viridi et al., 2003).

O grupo diabético não-tratado mostrou uma redução média de 7,4% nos níveis glicêmicos casuais, sendo que a glicemia permaneceu em níveis elevados, acima de 300 mg/dL. Os níveis elevados para as glicemias dos animais deste grupo permitem concluir que o aloxano foi capaz de induzir e manter o estado diabético durante o experimento. A redução porcentual média verificada no grupo pode ter sido em função do estímulo à diferenciação de células ductais pancreáticas em células beta, repondo algumas que foram destruídas pelo aloxano e em resposta aos estímulos desencadeados pelo peptídeo insulínico glicose-

dependente (GIP), um hormônio incretínico que apresentou valores semelhantes aos do Grupo Controle Sadio.

O Grupo Diabético Tratado foi o grupo que expressou a maior variação porcentual média para a glicemia, apresentando uma redução média de 12,4% nos índices glicêmicos. Essa redução pode estar associada aos valores médios encontrados para o hormônio incretina GIP no Grupo Diabético Tratado, que foram superiores em 70%, quando comparados aos valores médios encontrados para o Grupo Controle Sadio.

É comumente citado na literatura que uma droga é considerada eficaz quando reduz os níveis plasmáticos de parâmetros bioquímicos relacionados a uma determinada patologia, em pelo menos 15% dos valores iniciais (Martha et al., 2000). No presente trabalho, a administração da infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* em ratos diabéticos graves mostrou uma redução de 12,4% nos níveis glicêmicos. Pode-se então sugerir que um ajuste na dose administrada da infusão de *Momordica charantia* poderia aumentar a porcentagem de variação, ajustando-a aos valores referidos na literatura e confirmando a sua eficiência como agente hipoglicemiante.

A ação hipoglicemiante da *Momordica charantia* também é confirmada quando se compara as variações percentuais da glicemia entre os grupos Controle Sadio (aumento de 10,1%) e Sadio Tratado (diminuição de 0,38%).

A hemoglobina glicada, HbA<sub>1c</sub>, é o parâmetro laboratorial utilizado para a monitorização do diabetes por se tratar de um processo molecular no qual a glicose se incorpora à hemoglobina A quando a glicemia é mantida elevada durante os três meses precedentes (Watanabe et al., 1998).

No presente trabalho, os níveis de HbA<sub>1c</sub> foram verificados após 31 dias de hiperglicemia nos grupos diabéticos e os valores encontrados são próximos aos valores normais e semelhantes aos encontrados por Mainardes et al., 2007.

Os valores médios para a hemoglobina glicada e a glicemia casual após 25 dias da indução do diabetes encontram-se representados na tabela 4.

**Tabela 4.** Médias glicêmicas após 25 dias da indução do diabetes e níveis médios de HbA<sub>1c</sub>.

| Grupo                 | Glicemia casual após o experimento (mg/dL) | Hemoglobina glicada (%) |
|-----------------------|--|-------------------------|
| Controle sadio (7)    | 126,6 ± 8,7 (a)                            | 2,65 ± 0,07             |
| Sadio tratado (7)     | 115,3 ± 4,7 (a)                            | 2,41 ± 0,18             |
| Diabético (7)         | 317,3 ± 57,7 (b)                           | 2,63 ± 0,23             |
| Diabético tratado (8) | 381,0 ± 66,3 (b)                           | 2,93 ± 0,31             |

Valores expressos representam as médias ± erro padrão da média (EPM); médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente (P<0,05) entre si.

### **5.3.2. Peptídeo C, insulina e polipeptídeo insulínico glicose-dependente.**

O estudo da capacidade das células β em secretar insulina é ferramenta importante para a compreensão da história natural do DM e do impacto de novas terapias no controle e prevenção da doença. Atualmente, a avaliação da capacidade de secreção da insulina é indicada quando se torna difícil diferenciar, apenas com base na apresentação clínica, o diabético insulino-dependente do diabético não insulino-dependente (Service et al., 1997).

O conhecido processo de glicação aumentada no diabetes, pelo qual a glicose liga-se de maneira não-enzimática com diversas proteínas

formando produtos glicosilados e habitualmente avaliados pela presença de níveis aumentados de hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), também ocorre no interior da célula beta, nos grânulos de insulina, levando a secreção de insulina glicosilada, que apresenta uma atividade biológica reduzida. Assim, a glicotoxicidade na célula beta também deve contribuir para a resistência à ação da insulina (McKillop et al., 2002).

A mensuração dos produtos da célula beta disponíveis no sangue periférico é a forma utilizada para a avaliação funcional, por causa da elevada morbimortalidade associada às biópsias pancreáticas, sendo que estas não devem ser utilizadas para este fim (Tsai et al., 2006; Robertson, 2007).

Os resultados do presente trabalho referentes às quantificações plasmáticas para peptídeo C, insulina e GIP, são apresentadas na tabela 5.

**Tabela 5.** Médias plasmáticas para o peptídeo C, insulina e GIP, após 25 dias de experimento.

| Grupo                 | Peptídeo C<br>ng/mL | Insulina<br>(ng/mL) | GIP<br>pg/mL |
|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| Controle sadio (7)    | 2,62 ± 0,16         | 2,25 ± 0,25 (a)     | 15,23 ± 3,9  |
| Sadio tratado (7)     | 2,65 ± 0,11         | 1,26 ± 0,12 (b)     | 7,83 ± 0,5   |
| Diabético (7)         | 2,32 ± 0,13         | 0,79 ± 0,22 (c)     | 12,71 ± 2,4  |
| Diabético Tratado (8) | 2,34 ± 0,24         | 0,61 ± 0,10 (c)     | 25,59 ± 13,0 |

Valores expressos representam as médias ± erro padrão da média (EPM); médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem significativamente (P<0,05) entre si.

Verifica-se que os resultados obtidos para a insulina diferem significativamente (P < 0,05) entre as médias dos grupos Controle Sadio, Sadio tratado e Diabéticos. Entretanto, tal resultado tem interpretação limitada, pois a insulina apresenta meia vida curta (4 minutos), extração hepática variável pelo fenômeno da primeira passagem (40 a 60%) e

*clearance* intra e interindividual bastante variável. Assim, a insulinemia plasmática geralmente não reflete fidedignamente a capacidade de secreção das células beta pancreáticas (Vendrame et al., 2004).

A tabela 5 mostra também os valores médios encontrados para o peptídeo C, no plasma dos animais dos diversos grupos de tratamento. O peptídeo C tem algumas vantagens em relação à dosagem de insulina plasmática na avaliação funcional da célula beta. Além de ter meia vida mais longa (30 minutos), fato que implica em menor flutuação nos níveis plasmáticos, não sofre metabolização hepática significativa e possui filtração renal mais linear entre indivíduos. O peptídeo C conecta as cadeias A e B na pró-insulina e, após a clivagem da pró-insulina em insulina, o peptídeo C intacto permanece armazenado junto à insulina nos grânulos e é secretado juntamente com a insulina, em quantidades equimolares e, portanto, pode ser considerado um marcador independente da secreção de insulina (Palmer et al., 2004).

O peptídeo C pode ser dosado em estado basal, casual ou sob estímulo com glucagon (Vendrame et al., 2004). Nosso trabalho optou pela dosagem casual, baseado no estudo de Berger et al. (2000) que demonstrou que a medida ocasional do peptídeo C (em qualquer hora do dia, sem estímulo e independentemente do horário da última refeição) é equivalente à dosagem sob estímulo.

Por ser o peptídeo C uma molécula pequena, linear e propensa à degradação por enzimas proteolíticas, o sangue coletado foi separado imediatamente e o plasma congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  e dosado 10 dias após a coleta. Além disto, foi acrescentado ao sangue coletado, na proporção de 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de sangue total, um inibidor da enzima dipeptidil peptidase-4, visando a preservar tanto o peptídeo C quanto o peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP).

O peptídeo C é detectável se  $\geq 0,5$  ng/mL e considerado dentro da faixa de normalidade se entre 1,5 e 3,5 ng/mL (Vendrame et al., 2004).

Para o marcador de atividade da célula  $\beta$  pancreática, os resultados do presente trabalho mostram valores médios nos Grupos Diabético tratado/não-tratado, ao final de 25 dias do experimento, 11,57% menores do que os valores médios dos grupos Controle Sadio e Sadio Tratado, isto é, uma variação mínima considerando os elevados valores iniciais da glicemia dos animais com diabetes aloxânica, permitindo então concluir que o aloxano realmente trouxe danos às células  $\beta$ , mas que a função foi sendo recuperada ao longo dos 25 dias de tratamento, conclusão reforçada pela queda do nível glicêmico médio no grupo diabético-tratado.

O peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP) é um hormônio incretina que é liberado em resposta à ingestão de nutrientes. A liberação é rápida e níveis elevados desse hormônio são observados 15 minutos após a ingestão de uma refeição. Após a sua liberação pela célula K localizada no duodeno e jejuno proximal, é rapidamente inativado pela dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), tendo então um tempo de meia vida curto, estimado em  $5,0 \pm 1,2$  minutos. (Melor e Nauck, 2004; Baggio e Drucker, 2004).

Em nosso trabalho, imediatamente após a coleta do sangue, foi acrescentado 10  $\mu$ L/mL de um inibidor de DPP-4, visando a preservar a incretina GIP presente no sangue. Na seqüência, o plasma foi separado e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  sendo a dosagem efetuada por protocolo imunoenzimático (ELISA).

A média dos níveis plasmáticos para o GIP nos animais do Grupo Diabético Tratado foi determinada em 25,59 pg/mL e a dos animais do Grupo Controle Sadio, 15,23 pg/mL, o que representa 68,02% a mais na concentração do GIP. Comparando a média dos níveis plasmáticos do

GIP dos animais do Grupo Diabético Tratado (25,59 pg/mL) com a média dos níveis plasmáticos dos animais do Grupo Diabético não-tratado (12,71 pg/mL), verifica-se um acréscimo de 101,3% a favor dos animais do Grupo Diabético Tratado.

Estes resultados mostram que a administração diária da infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* promoveu um aumento significativo nos níveis plasmáticos do hormônio incretina GIP no Grupo Diabético Tratado, fato que, associado aos resultados obtidos para os níveis de peptídeo C permite concluir que durante o experimento houve uma ação preservadora/indutora para a secreção insulínica nas ratas portadoras de diabetes aloxânica.

Menores níveis plasmáticos de insulina alteram todo o metabolismo protéico, inibindo a síntese e aumentando o catabolismo, lançando grandes quantidades de aminoácidos no plasma, que são usados como substrato para fins energéticos ou para a gliconeogênese (Guyton e Hall, 1998). Ao término do experimento, no momento do sacrifício dos animais e subsequente autópsia, foi possível visualizar claramente que a massa muscular dos animais diabéticos tratados, não diferia da massa muscular dos animais do Grupo Controle Sadio, indicando que o efeito anabólico da insulina esteve presente durante o experimento ou que o efeito catabólico esteve ausente, isto é, existia uma atividade insulínica adequada.

## **7. Conclusão e perspectivas.**

Os dados apresentados neste estudo mostraram que a infusão aquosa do pó dos frutos de *Momordica charantia* causa diminuição nos índices glicêmicos em ratas com diabetes aloxânica, elevação dos níveis plasmáticos do hormônio polipeptídeo insulínico dependente (GIP) e, provavelmente, exerce efeito semelhante em humanos, confirmando o descrito pela etnofarmacologia da espécie vegetal.

Dentro deste contexto, os resultados encontrados neste estudo servem com referência para futuras pesquisas que busquem elucidar como e qual(is) componente(s) da *Momordica charantia* promove(m) uma elevação significativa dos níveis do hormônio incretina GIP, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antidiabéticos.

## 8. Referências bibliográficas.

- ABASCAL, K.; YARNELL, N. D. Using bitter melon to treat diabetes. **Alternative and Complementary Therapies**, v.11, n.4, p.179-184, 2005.
- AHMED, I.; ADEGHATE, E.; SHARMA, A. K. et al. Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.40, n.3, p.145-151, 1998.
- AL-RASHEED N.; MEAKIN F.; ROYAL E. et al. Potent activation of multiple signalling pathways by C-peptide in opossum kidney proximal tubular cells. **Diabetologia**, v.47, n.6, p.987-997, 2004.
- AMERICAN ASSOCIATION COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY. Medical guidelines for the management of diabetes mellitus: the AACE system of intensive diabetes self-management-2002. UPDATE. **Endocrine Practice**, v.8, s.1, p.40-82, 2002.
- AMERICAN COLLEGE OF ENDOCRINOLOGY CONSENSUS STATEMENT ON GUIDELINES FOR GLYCEMIC CONTROL. **Endocrine Practice**, v.8, s.1, p.5-11, 2002.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. STANDARD OF MEDICAL CARE IN DIABETES – 2007. **Diabetes Care**, v.30, s.1, p.S4-S41, 2007.
- ASSUBAIE, N. F.; EL-GARAWANY, M. M. Evaluation of some important chemical constituents of *Momordica charantia* cultivated in Hofuf, Saudi Arabia. **Journal of Biological Sciences**, v.4, n.5, p.628-630, 2004.
- AVEZUM, A.; PIEGAS L. S.; PEREIRA, J. C. R. Risk factors associated with acute myocardial infarction in the São Paulo metropolitan region. A developed region in a developing country. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.84, n.3, p.206-213, 2005.
- BAHIA, L.; GOMES, M. B.; DA CRUZ, P. M. et al. Coronary artery disease, microalbuminuria and lipid profile in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.73, n.1, p.11-22, 1999.
- BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.18, n.4, p.531-554, 2004.

- BANTING, F. G.; BEST, C. H.; COLLIP, J. B.; CAMPBELL, W. R.; FLETCHER, A. A. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. **Canadian Medical Association Journal**, v.12, n.3, p.141-146, 1922.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MARTINS, V. K. M.; RABELO, L. A. et al. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). A review between 1980-2000. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.421-446, 2006.
- BARCELÓ, A.; RAJPATHAK, S. Incidence and prevalence of diabetes mellitus in the Americas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.10, n.5, p.300-308, 2001.
- BARCELÓ, A.; AEDO, C.; RAJPATHAK, S. et al. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organization**, v.81, n.1, p.19-27, 2003.
- BASTYR, E. J.; STUART, C. A.; BRODOWS, R. G. et al. Therapy focused on lowering postprandial glucose, not fasting glucose, may be superior for lowering HbA1c. **Diabetes Care**, v.23, n.9, p.1236-1241, 2000.
- BECKMAN, J. A.; GOLDFINE, A. B.; GORDON, M. B. et al. Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. **Circulation**, v.103, n.9, p.1618-1623, 2001.
- BERGER, B.; STRENSTROM, G.; SUNDKVIST, G. Random C-peptide in the classification of diabetes. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, v.60, n.8, p.687-693, 2000.
- BRANSOME, E. D. Financing the care of diabetes mellitus in the U.S. **Diabetes Care**, v.15, s.1, p.1-5, 1992.
- BREKKE, I. B.; HOSTMARK, A. T.; FLATEN, O. et al. Effect of pancreas transplantation on plasma lipids and plasma concentration of pancreatic hormones in streptozotocin diabetic rats. **European Surgical Research**, v.13, n.5, p.361-370, 1981.
- BRUCE D.G.; STORLIEN L.H.; FURLER S.M. et al. Cephalic phase metabolic responses in normal weight adults. **Metabolism**, v.36, n.8, p.721-725, 1987.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

CAVALLI, V. L. L. O.; SORDI, C.; TONINI, K. et al. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.64-70, 2007.

CERIELLO A.; QUAGLIARO L.; PICONI L. et al. Effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on circulating adhesion molecules and oxidative stress generation and the possible role of sinvastatin treatment. **Diabetes**, v.53, n.3, p.701-710, 2004.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compos-tos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre a modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v.21, n.1, p.99-105, 1998.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National diabetes fact sheet: general information and national estimates on diabetes in the United States. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention. 2005. [http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs\\_2005.pdf](http://www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/ndfs_2005.pdf). Acessado em 21/10/2008.

CHEN, Y.E.; DRUCKER, D.J. Tissue-specific expression of unique mRNAs that encode proglucagon-derived peptides or exendin 4 in the lizard. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, n.7, p.4108-4115, 1997.

CHOY, M.; LAM, S. Sitagliptin: a novel drug for the treatment of type 2 diabetes. **Cardiology in Review**, v.15, n.5, p.264-271, 2007.

CONSENSO BRASILEIRO SOBRE DIABETES 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. Rio de Janeiro: Diagraphic Editora, 2003. 75p.

CONSOLI A.; NURJHAN N.; CAPANI F. et al. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. **Diabetes**, v.38, n.5, p.550-557, 1989.

CORREA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas cultivadas**, Ministério da Agricultura, IDBF, Rio de Janeiro, 1984, Volumes I – VI.

COUTINHO, M.; GERSTEIN, H. C.; WANG, Y. et al. The relationship between glucose and incident cardiovascular events: a metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. **Diabetes Care**, v.22, n.2, p. 233-240, 1999.

DACHICOURT, N.; SERRADAS, P.; BAILBE, D.; KERGOAT, M.; DOARE, L.; PORTHA, B. Glucagon-like peptide-1(7-36)-amide confers glucose sensitivity to previously glucose-incompetent beta-cells in diabetic rats: in vivo and in vitro studies. **Journal of Endocrinology**, v.155, n.2, p.369-376, 1997

DEACON C.F. Dipeptidyl peptidase 4 inhibition with sitagliptin: a new therapy for type 2 diabetes. **Expert Opinion of Investigational Drugs**, v.16, n.4, p.533-545, 2007.

DEACON, C.F. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. **Diabetes**, v.53, p.9, p.2181-2189, 2004.

DEACON, C.F.; NAUCK, M.A.; TOFT-NIELSEN, M.; PRIDAL, L.; WILLMS, B.; HOLST, J.J. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH<sub>2</sub>-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. **Diabetes**, v.44, n.9, p.1126-1131, 1995.

DECODE STUDY GROUP ON BEHALF OF THE EUROPEAN DIABETES EPIDEMIOLOGY GROUP. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetic Association Diagnostic Criteria. **Lancet**, v. 354, n. 9179, p.617-621, 1999.

DE VENCIANA, C. A.; MORGAN, M. A.; TAMEROU, A. et al. Postprandial versus preprandial blood glucose monitoring in women with gestational diabetes mellitus requiring insulin therapy. **New England Journal of Medicine**, v.333, n.19, p.1237-1241, 1995.

DEL PRATO, S.; MARCHETTI, P.; BONADONNA, R. C. Phasic insulin release and metabolic regulation in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.51 s.1, p. S109-S116, 2002.

DE VEGT, F.; DEKKER, J. M.; RUHÈ, H. G. et al. Hyperglycaemia is associated with all-cause and cardiovascular mortality in the Hoorn population: the HoornStudy. **Diabetologia**, v.42, n.8, p.926-931, 1999.

DINNEEN, S.; GERICH, J.; RIZZA, R. Carbohydrate metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v.327, n.10, p.707-713, 1992.

DINIZ, M. F. F.; OLIVEIRA, R. A. G.; MEDEIROS, A. C. D. et al. **Memento fitoterápico: as plantas como alternativa terapêutica aspectos populares e científicos**. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 1997. 205p.

DONAHUE, R. P.; ABBOTT, R. D.; REED, D. M. et al. Postchallenge glucose concentration and coronary heart disease in men of Japanese ancestry: Honolulu Heart Program. **Diabetes**, v.36, n.6, p. 689-692, 1987.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metabolism**, v.3, n.3, p. 153-165, 2006.

DRUCKER, D. J. The role of gut hormones in glucose homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.1, p.24-32, 2007.

DUBICK, A. M. Historical perspectives on the use of herbal preparations to promote health. **Journal of Nutrition**, v.116, n.7, p.1348-1354, 1986.

EKBERG, K.; BRISMAR, T.; JOHANSSON, B. L. et al. Amelioration of sensory nerve dysfunction by C-peptide in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v.52, n.2, p.536-541, 2003.

FARILLA, L.; HUI, H.; BERTOLOTTA, C.; KANG, E.; BULOTTA, A. et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. **Endocrinology**, v.143, n.11, p.4397-4408, 2002.

FERNQVIST-FORBES, E.; JOHANSSON, B. L.; ERIKSSON, M. Effects of C-peptide on forearm blood flow and brachial artery dilatation in patients with type 1 diabetes. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.172, n.3, p.159-165, 2001.

FONTBONNE, A.; ESCHWEGE, E.; CAMBIEN, F. et al. Hypertriglyceridaemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. Results from the 11-year follow-up of the Paris Prospective Study. **Diabetologia**, v.32, n.5, p. 300-304, 1989.

FORST, T.; KUNT, T.; POHLMANN, T. et al. Biological activity of C-peptide on the skin microcirculation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v.101, n.10, p.2036-2041, 1998.

FESKENS, E. J.; KROMHOUT, D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. **The Journal of Clinical Epidemiology**, v.45, n.11, p.1327-1334, 1992.

FULLER, J. H.; SHIPLEY, M. J.; ROSE, G. et al. Coronary heart disease risk and impaired glucose tolerance: the Whitehall Study. **Lancet**, v.1, n.8183, p.1373-1376, 1980.

GAVIN III, J.R. Pathophysiologic mechanisms of postprandial hyperglycemia. **The American Journal of Cardiology**, v.88, n.6A, p.4H-8H, 2001.

GERSTER, H. The potential role of lycopene for human health. **Journal of American College of Nutrition**, v.16, n.2, p. 109–126, 1997.

GIRON, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CACERES, A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.2-3, p.173–187, 1991.

GIULIANO, D.; MARFELLA, R.; COPPOLA, L. et al. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine: evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. **Circulation**, v.95, n.7, p.1783-1790, 1997.

GRENAND, P.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H. **Pharmacopées traditionnelles en Guyane-créoles, paçikur, wayâpi**. Paris: Éditions de l'ORSTOM/Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération. 1987. 569p.

GROMADA, J.; BOKVIST, K.; DING, W. G. et al. Glucagon-like peptide 1 amide stimulates exocytoses in human pancreatic beta-cells by both proximal and distal regulatory steps in stimulus-secretion coupling. **Diabetes**, v.47, n.1, p.57-65, 1998.

GROVER, J. K.; YADAV, S. P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, n.1, p.123–132, 2004.

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

GROVER, J. K.; VATS, V.; RATHI, S. S. et al. Traditional indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n.3, p. 233-236, 2001.

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

GRUNBERGER, G.; QIANG, X.; LI, Z. et al. Molecular basis for the insulinomimetic effects of C-peptide. **Diabetologia**, v.44, n.10, p.1247-1257, 2001.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica** 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 639p.

HALLER, H. Postprandial glucose and vascular disease. **Diabetic Medicine**, v.14, n.53, p.S50-S56, 1997.

HAFFNER, S. M.; LEHTO, S.; RONNEMMA, T. et al. Mortality from coronary artery disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **New England Journal of Medicine**, v.339, n.4, p.229-234, 1998.

HANSEN, A.; JOHANSSON, B. L.; WAHREN, J. et al. C-peptide exerts beneficial effects on myocardial blood flow and function in patients with type 1 diabetes. **Diabetes**, v.51, n.10, p.3077-3082, 2002.

HEINE, R. J.; DEKKER, J. M. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. **Diabetologia**, v.45, n.4, p.461-75, 2002.

HINNEN, D.; NIELSEN, L.L.; WANINGER A.; KUSHNER P. Incretin mimetics and DPP-IV inhibitors: new paradigms for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of the American Board of Family Medical**, v.19, n.6, p.612-620, 2006.

HOOGWERF, B.; BANTLE, J.; GAENSLEN, H. et al. Infusion of synthetic human C-peptide does not affect plasma glucose, serum insulin, or plasma glucagon in healthy subjects. **Metabolism**, v.35, n.2, p.122-125, 1986.

HOLST, J.J.; GROMADA, J. Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. **American Journal Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.287, n.2, E199-E206, 2004.

HUANG, D. Y.; RICHTER, K.; BREINDENBACH, A. et al. Human C-peptide acutely lowers glomerular hyperfiltration and proteinuria in diabetic rats: a dose-response study. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v.365, n.1, p.67-73, 2002.

HUYSKENS, S.; MENDLINGER, S.; BENZIONI, A. et al. Optimization of agrotechniques for cultivating *Momordica charantia* (karela). **Journal of Horticultural Science**, v.67, n.2, p.259-264, 1992.

IDO, Y.; VINDIGNI, A.; CHANG, K. et al. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. **Science**, v.277, n.5325, p.563-566, 1997.

IVORRA, M.D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, n.3, p. 243-275, 1989.

JOHANSSON, B. L.; KERNELL, S.; SJÖBERG, S. et al. Influence of combined C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes type 1. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.77, n.4, p.976-981, 1993.

JOHANSSON, B.L.; BORG, K.; FERNQVIST-FORBES, E. et al. Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with type I diabetes a three-month study. **Diabetic Medicine**, v.17, n.3, p.181-189, 2000.

JOHANSSON, B.L.; BORG, K.; FERNQVIST-FORBES, E. et al. C-peptide improves autonomic nerve function in IDM patients. **Diabetologia**, v.39, n.6, p.687-695, 1996.

KANNEL, W. B.; MCGEE, D. L. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. **The Journal of the American Medical Association**, v.241, n.19, p.2035-2038, 1979.

KAPLAN, N. N. The deadly quartet. Upper body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. **Archives of Internal Medicine**, v.149, n.7, p.1514-1520, 1989.

KIEFFER, T.J.; MCINTOSH, C.H.; PEDERSON, R.A. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. **Endocrinology**, v.136, n.8, p.3585-3596, 1995.

KIM, S. J.; WINTER, K.; CUILAN, N. et al. GIP stimulation of pancreatic beta-cells survival is dependent upon phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3-K)/protein kinase B (PKB) signaling, inactivation of the forkhead transcription factor Foxo1 and downregulation of bax expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.23, p. 22297-22307, 2005.

KULKARNI, R.N.; WINNAY, J.N.; DANIELS, M. et al. Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured beta-cell lines. **The Journal of Clinical Investigation**, v.104, n.12, p.69-75, 1999.

LAAKSO, M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Diabetes**, v.48, n.5, p.937-942, 1999.

LANS, C.; BROWN, G. Observations on ethnoveterinary medicines in Trinidad and Tobago. **Preventive Veterinary Medicine**, v.35, n.2, p.125-142, 1998.

LEBOVITZ, H.E. A Symposium: Managing the atherogenic potential of the postprandial state. **The American Journal of Cardiology**, v.88, s.1, p.1H-3H, 2001A.

LEBOVITZ, H.E. Effect of the postprandial state on nontraditional risk factors. **The American Journal of Cardiology**, v.88, n.6A, p.20H-25H, 2001B.

LEE, I. K.; KIM, H. S.; BAE, J. H. Endothelial dysfunction: its relationship with acute hyperglycemia and hyperlipidemia. **International Journal of Clinical Practice**. Supplement, n.129, p.59-64, 2002.

LEE, W. L.; CHEUNG, A. M.; CAPE, D.; et al. Impact of diabetes on coronary artery disease in women and men: a meta-analysis of prospective studies. **Diabetes Care**, v.23, n.7, p.962-968, 2000.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v.31, n.6, p.337-342, 1988 (Review)

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia** v.51, n.2 p.216-226, 2008.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. D.; MACHADO, J. L. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.2, p.132-142, 2003.

LI, Z.; ZHANG, W.; SIMA, A. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.19, n.5, p.375-385, 2003.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil – terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**, 3<sup>a</sup> ed. Instituto Plantarum. Nova Odessa-SP, 2000. 640p.

LUKENS, F. D. W. Alloxan diabetes. **Physiological Reviews**, v.28, n.3, p.304-330, 1948, *apud* **Acta Cirúrgica Brasileira** v.18, n.2, p.132-142, 2003.

LUZI, L.; DE FRONZO, R. A. Effect of loss of first-phase insulin secretion on hepatic glucose production and tissue glucose disposal in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.257, n.2, p.E241-E246, 1989.

MAINARDES, K. C.; VIANA NETO, R.; DONOSO, C. P. M. et al. Efeito do diabetes associado ao envelhecimento na consolidação de fraturas na tíbia de ratos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.42, n.3, p.55-63, 2007.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. The Brazilian cooperative group on the study of diabetes prevalence. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v.15, n.11, p.1509-1516, 1992.

MARFELLA, R.; VERRAZZO, G.; ACAMPORA, R. et al. Glutathione reverses systemic hemodynamic changes by acute hyperglycemia in healthy subjects. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.268, n.6, p.E1167-E1173, 1995.

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

MARTHA, R. C. D.; POUBEL, J.; FERREIRA, L. C. L. et al. Atividade hipoglicêmica de *Averrhoa carambola* L. usada em Manaus como antidiabético. **NewsLab**, n.38, p.142-148, 2000.

MATOS, F. J. A. **O formulário fitoterápico do professor Dias da Rocha: informações sobre o emprego na medicina caseira de plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 2<sup>a</sup> ed. Fortaleza: EUFC, 1997. 260p.

MATSUBARA, B. B.; OKOSHI, K.; OKOSHI, M. P. et al. Arterial dysfunction as a possible mechanism of cardiac injury in type. A doppler-echocardiographic study. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.69, n.3, p.155-159, 1997.

MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. S.; FILAPPI, A. et al. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais diabéticos. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1061-1065, 2003.

MCKILLOP, A.M.; ABDEL-WAHAB, Y.H.; MOONEY, M.H. et al. Secretion of glycated insulin from pancreatic beta-cells in diabetes represents a novel aspect of beta-cell dysfunction and glucose toxicity. **Diabetes & Metabolism**, v.28, n.6, p.3S61-3S69, 2002.

MELOR, J. J.; NAUCK, M. A. Glucose-dependent insulintropic polypeptide/Gastric inhibitory polypeptide. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.18, n.4, p.587-606, 2004.

MEYER, U.; GRESSNER, A. M. Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. **Clinical Chemistry**, v.50, n.9, p.1511-1525, 2004.

MIURA, T.; ITOH, Y.; IWAMOTO, N. et al. Suppressive activity of the fruit of *Momordica charantia* with exercise on blood glucose in type 2 diabetic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.2 p.248-250, 2004.

MIYAWAKI, K.; YAMADA, Y.; YANO, H. et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.26, p.14843-14847, 1999.

MITRAKOU, A.; KELLEY, D.; MOKAN, M. et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insulin release in impaired glucose tolerance. **New England Journal of Medicine**, v.326, n.1, p.22-29, 1992.

- MONNIER, L.; LAPINSKI, H.; COLETTE, C. Contributions of fasting and post-prandial plasma glucose increments to overall diurnal hyperglycemia of type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v.26, n.3, p.881-885, 2003.
- MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; SOUZA, A. et al. Da desnutrição para a obesidade: a transição nutricional no Brasil. In: Monteiro C.A. (org.). **Velhos e novos males da saúde no Brasil: a evolução do país e de suas doenças**. São Paulo: Hucitec, Nupens/USP, 1995, 440p.
- MORAES, S. A.; DE SOUZA, J. M. Diabetes Mellitus and ischemic heart disease. Comparison by gender. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.66, n.2, p.59-63, 1996.
- MROZIKIEWICZ, A.; KIELCZEWSKA-MROZIKIEWICZ, D.; LOWICKI, Z. et al. Blood levels of alloxan in children with insulin-dependent diabetes mellitus. **Acta Diabetologica**, v.31, n.4, p.236-237, 1994.
- MENTLEIN, R.; GALLWITZ, B.; SCHMIDT, W.E. Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. **European Journal of Biochemistry**, v.214, n.3, p.829-835, 1993.
- MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. **Global comparative assessments in the health sector: disease burden, expenditures and intervention packages**. Geneva: World Health Organization, 1994, 204p.
- NUCCI, L. B.; TOSCANO, M.C.; MAIA, A.L.M. et al. A nationwide population screening program for diabetes in Brazil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.16, n.5, p. 320-327, 2004
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **A diabetes initiative for the Americas**. Disponível em [www.paho.org/english/HCP/HCN/IPM/dia-diabetesmellitus.htm](http://www.paho.org/english/HCP/HCN/IPM/dia-diabetesmellitus.htm). Acessado em 21 de outubro de 2008.
- PALMER, J. P.; FLEMING, G. A.; GREENBAUM, C. J. et al. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve  $\beta$ -cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes** v.53, n.1, p. 250-264, 2004.
- PRESTA, G. A.; PEREIRA, N. A. Atividade do Abagerú (*Chrysobalanus icaco* L., Chrysobalanaceae) em modelos experimentais para o estudo de plantas hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Farmácia**, n.68, p.91-101, 1987.

POITOUT, V.; ROBERTSON, R. P. Minireview: secondary beta-cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. **Endocrinology**, v.143, n.2, p.339-342, 2002.

PYORALA, K. Relationship of glucose tolerance and plasma insulin to the incidence of coronary heart disease: results from two population studies in Finland. **Diabetes Care**, v.2, n.2, p.131-141, 1979.

RAMALHO, A.C. Insulina e hipoglicemiantes orais. In: **Silva P. Farmacologia**. 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998, p.746-748.

RAO, K. V. K.; SCHWARTZ, S. A.; NAIR, H. K. et al. Plant derived products as a source of cellular growth inhibitory phytochemicals on PC-3M, DU-145 and LNCaP prostate cancer cell lines. **Current Science**, v.87, n.11, p.1585-1588, 2004.

RAO, B. K.; KESAVULU, M. M.; APPARAO, C. H. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetics rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.78, n.1, p.67-71, 2001.

REAVEN G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v.37, n.12, p.1595-1607, 1988.

REBSOMEN, L.; PITEL, S.; BOUBRED, F. et al. C-peptide replacement improves weight gain and renal function in diabetic rats. **Diabetes & Metabolism**, v.32, n.3, p.223-228, 2006.

REYES, M.E.C.; GILDEMACHER, B.H.; JANSEN, G.J. *Momordica L.* In: Pudoc Scientific Publishers (ed). **Plant Resources of South-East Asia n° 8: Vegetables**. Wageningen, Netherlands, 1993, p. 206–210.

RIBEIRO, L. F. C.; MELLO, A. P. A.; BEDENDO, I. P. et al. Ocorrência de um fitoplasma do grupo 16SrIII associado ao enfezamento em melão de São Caetano (*Momordica charantia L.*) no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica Botucatu**, v.30, n.3, p.391-393, 2004.

ROBERTSON, R.P. Estimation of beta cell mass by metabolic tests: necessary, but how sufficient? **Diabetes**, v.56, n.10, p.2420-2424, 2007.

ROBINSON, R. W.; DECKER-WALTER, D. S. Cucurbits. New York: Cab International, 1997. 226p. apud Bezerra, A.M.E., Momente, V.G., Araújo, E.C., Medeiros Filho, S. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melão-de-são-caetano em diferentes ambientes e substratos. **Ciência Agrônômica**, v.33, n.1, p.39-44, 2002.

ROBINSON R.W.; DECKER-WALTERS D.S. **Cucurbits**. New York: Cab International. 1997. 226p.

- SANTILLI, F.; CIPOLLONE, F.; MEZZETTI, A. et al. The role of nitric oxide in the development of diabetic angiopathy. **Hormone and Metabolic Research**, v.36, n.5, p.319-335, 2004.
- SAYDAH, S. H.; FRADKIN, J.; COWIE, C. C. Poor control of risk factors for vascular disease among adults with previously diagnosed diabetes. **The Journal of the American Medical Association**, v.291, n.3, p.335-342, 2004.
- SENANAYAKE, G. V. K.; MARUYAMA, M.; SHIBUYA, K. et al. The effects of bitter melon (*Momordica charantia*) on serum and liver triglyceride levels in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, n.2-3, p.257-262, 2004.
- SERVICE, F. J.; RIZZA, R. A.; ZIMMERMAN, B. R. et al. The classification of diabetes by clinical and C-peptide criteria. A prospective population based study. **Diabetes Care**, v.20, n.2, p.198-201, 1997.
- SIMA, A.A.; ZHANG, W.; LI, Z.G. et al. Molecular alterations underlie nodal and paranodal degeneration in type 1 diabetic neuropathy and are prevented by C-peptide. **Diabetes**, v.53, n.6, p.1556-1563, 2004.
- SINGH-FRANCO, D.; ROBLES, G.; GAZZE, D. Pramlintide acetate injection for the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clinical Therapeutics**, v.29, n.4, p.535-562, 2007.
- STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J. D. et al. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Interventional Trial. **Diabetes Care**, v.16, n.2, p.434-444, 1993.
- TSAI, E. B.; SHERRY, N. A.; PALMER, J. P. et al. For the DPT\_1 study group. The rise and fall of insulin secretion in type 1 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.49, n.2, p.261-270, 2006.
- TSENG, C. C.; KIEFFER, T. J.; JARBOE, L. A. et al. Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulintropic polypeptide receptor antagonist in rat. **The Journal of Clinical Investigations**, v.98, n.11, p.2440-2445, 1996.
- TRÜMPER, A.; TRÜMPER, K.; TRUSHEIM, H. et al. Glucose-dependent insulintropic polypeptide is a growth factor for beta-cells by pleiotropic signaling. **Molecular Endocrinology**, v.15, n.9, p. 1559-1570, 2001.

- UNITED KLINGDON PROSPECTIVE DIABETES STUDY. A randomized trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes (UKPDS 28). **Diabetes Care**, v.21, n.1, p.87-92, 1998.
- UNITED KLINGDON PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Overview of 6 year's therapy of type II diabetes: a progressive disease (UKPDS 16). **Diabetes**, v.44, n.11, p.1249-1258, 1995.
- UNITED KLINGDON PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood-glucose control with sulphonylurea or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet**, v.352, n.9131, p.837-853, 1998.
- VAGUE, P.; COSTE, T. C.; JANNOT, M. F. et al. C-peptide, Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase, and diabetes. **Experimental Diabetes Research**, v.5, n.1, p.37-50, 2004.
- VENDRAME, F.; ZAPPATERRENO, A.; DOTTA, F. Markers of  $\beta$  cell function in type 1 diabetes mellitus. **Minerva Medica**. v.95, n.2, p.79-84, 2004.
- VINNING, G. **Market Compendium of Asian Vegetables**. RIRDC Research Paper No. 95/12. Canberra, Rural Industries Research and Development Corporation, 1995. 386 p.
- VIRDI, J.; SIVAKAMI, S.; SHAHANI, S. et al. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.1, p.107-111, 2003.
- VISBOLL, T.; HOLST, J. J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v.47, n.3, p.357-366, 2004.
- YANEY, G. C.; CORKEY, B. E. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v.46, n.10, p.1297-1312, 2003.
- YANG, S. L.; WALTERS, T. W. Ethnobotany and the economic role of the *Cucurbitaceae* of China. **Economic Botany**, v.46, n.4, p.349-367, 1992.
- YIP, R.G.; BOYLAN, M.O.; KIEFFER, T.J. et al. Functional GIP receptors are presents on adipocytes. **Endocrinology**, v.139, n.9, p.4004-4007, 1998.
- YUWAI, K. E.; RAO, K. S.; KALUWIN, C. et al. Chemical composition of *Momordica charantia* L. Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, n.10, p.1762-1763, 1991.

ZANDER, M.; MADSBAD, S.; MADSEN, J.L.; HOLST, J.J. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and beta-cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. **Lancet**, v.359, n.9309, p.824-830, 2002.

ZANOELLO, A. M.; MELAZZO-MAZZANTI, C.; KERPEL-GINDRI, J. et al. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra diabetes mellitus induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmaceutica Bonaerense** v.21, n.1, p.31-36, 2002.

ZIERATH, J.; HANDBERG, A.; TALLY, M. et al. C-peptide stimulates glucose transport in isolated human skeletal muscle independent of insulin receptor and tyrosine kinase activation. **Diabetologia**, v.39, n.3, p.306-313, 1996.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.M.M.; SHAW, J. Insight review articles global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v.414, n.6865, p.782-787, 2001.

WAHREN, J.; SHAFQAT, J.; JOHANSSON, J. et al. Molecular and cellular effects of C-peptide: new perspectives on an old peptide. **Experimental Diabetes Research**, v.5, n.1, p.15-23, 2004.

WAHREN, J.; EKBERG, K.; JOHANSSON, J. et al. Role of C-peptide in human physiology. **American Journal of Physiology – Endocrinology & Metabolism**, v.278, n.5, p.E759-E768, 2000.

WALTERS, T.W.; DECKER-WALTERS, D.S. Balsam-pear (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae). **Economic Botany**, v.42, n.2, p.286-292, 1988.

WAJCHENBERG, B. L. Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. **Endocrine Reviews**, v.28, n.2, p.187-218, 2007.

WATANABE, T.; KATO, K.; YAMADA, D. et al. A nondiabetic case of hemoglobin variant (Hb Niigata) with inappropriately high and low HbA1c titers detected by different methods. **Clinical Chemistry**, v.44, n.7, p.1562-1564, 1998.

WEYER, C.; BORGADUS, C.; MOTT, D.M. et al. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. The **Journal of Clinical Investigation**, v.104, n.6, p.787-794, 1999.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A. et al. Global prevalence of Diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care** v.27, n.5, p.1047-1053, 2004.

KRONENBERG, H.M. **Williams Textbook of endocrinology**. 11<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W. B. Saunders, 2007. 1936p.

WOERLE, H. J.; PIMENTA, W. P.; MEYER, C. et al. Diagnostic and therapeutic implications of relationships between fasting, 2-hour postchallenge plasma glucose and hemoglobin A<sub>1c</sub> values. **Archives of Internal Medicine**, v.164, n.15, p.1627-1632, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes programme.

[http://www.who.int/diabetes/facts/world\\_figures/em](http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/em). Acesso em 21/10/2008.