

VERA LUCIA DIAS SIQUEIRA

**PADRONIZAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INVESTIGAÇÃO DE  
PRODUTOS NATURAIS BIOLÓGICAMENTE ATIVOS COM POTENCIAIS  
ANTIDIABÉTICO E HIPOLIPEMIANTE EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto B. Bazotte

**MARINGÁ  
2003**

VERA LUCIA DIAS SIQUEIRA

PADRONIZAÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS PARA INVESTIGAÇÃO DE  
PRODUTOS NATURAIS BIOLOGICAMENTE ATIVOS COM POTENCIAIS  
ANTIDIABÉTICO E HIPOLIPEMIANTE EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

---

---

*À Deus, Ser maior que conduz meus passos;*

*Ao Gilmar, Augusto e Heloísa, razões de  
minha existência;*

*Ao meu pai, incentivador constante;*

*À minha mãe, com saudades.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Dr. Roberto Barbosa Bazotte, pela constante disponibilidade, paciência e dedicação com que me orientou. Atitude própria dos grandes sábios que, apesar da profunda sabedoria, espelham humildade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que através da coordenação do professor Dr. Diógenes A. G. Cortez, nos proporcionou as condições necessárias para realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, que com dedicação nos transmitiram seus preciosos conhecimentos.

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia, por todo apoio dispensado.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Departamento de Análises Clínicas, pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de Farmacologia Endócrina, Carlos Eduardo de Oliveira, que dedicou horas de seu valioso tempo em meu favor e sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Ao pessoal de apoio do laboratório de Farmacologia Endócrina, em especial a Solidalva C.F. de Oliveira, por toda preciosa ajuda concedida.

Ao laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia e Farmacologia desta universidade, em especial ao professor Dr. Diógenes A. Cortez, pela preparação do extrato bruto de *Cissus sicyoides*.

Aos amigos do curso de pós-graduação, pelo constante incentivo, pela amizade plena e sincera e pelo apoio nos momentos mais decisivos.

Ao colega de curso Ricardo Galletto, companheiro, amigo e colaborador, pela paciência com que me ensinou o manuseio dos animais e demais procedimentos necessários.

Ao professor Arildo José Brás de Oliveira pela colaboração nas investigações iniciais do extrato de berinjela e pelos valiosos conselhos.

Aos professores da disciplina de Bacteriologia Clínica, professor Francisco Herrero, professoras Jane M. G. Mikcha e Rosilene F. Cardoso, pelo apoio e incentivo conferido nas horas necessárias.

Ao pessoal técnico e de apoio do laboratório de Bacteriologia Clínica, em especial a Rubia A. F. de Pádua e Sônia A. S. Bertão, pelo incentivo e apoio constantes.

Às professoras Terezinha I.E. Svidzinski e Lourdes G. Botelho, pelos incentivos iniciais e valiosos conselhos.

Ao pessoal técnico administrativo, na pessoa de Francisca Helena M. de Carvalho, pela dedicação e qualificada cooperação.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

## RESUMO

Modelos experimentais empregando animais de laboratório têm um importante papel no desenvolvimento de novos fármacos. Porém, uma escolha apropriada de cada modelo experimental deve ser executada, já que não existe um modelo animal capaz de esclarecer todas as hipóteses. Assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar modelos experimentais para investigação de atividade antidiabética e hipolipemiante de produtos naturais biologicamente ativos (PNBAs) em ratos Wistar. Os modelos foram constituídos para avaliar o efeito agudo ou crônico de PNBAs. Observamos que os ratos Wistar responderam a acarbose, insulina, quitosana ou orlistat de modo semelhante aos humanos, representando modelos para investigação de PNBAs com potencial antidiabético e hipolipemiante. Entretanto a resposta a sinvastatina ou ciprofibrato foi diferente da observada em humanos, mostrando que ratos Wistar poderiam ser empregados em “*screenings*” farmacológicos para avaliar PNBAs com potencial hipolipemiante desde que se leve em consideração esta diferença. Além disso, ratos Wistar com diabetes induzida por aloxana, apesar da possível reversão parcial do diabetes, poderiam constituir modelos experimentais adequados para investigação de PNBAs com potencial antidiabético. Entretanto, uma tendência à normalização nas concentrações séricas de lipídeos limitam o emprego destes animais diabéticos para avaliação de PNBAs com potencial hipolipemiante. Finalmente, a *Solanum melongena* e o *Cissus sicyoides*, empregados em nossos experimentos, não apresentaram efeito antidiabético ou hipolipemiante.

Palavras-chave: Ratos Wistar; Modelo experimental; Atividade antidiabética; Atividade hipolipemiante; Produtos naturais.

## ABSTRACT

Experimental models using lab animals have an important role in the pharmacological studies of new drugs. However, an appropriated choice of each model must be performed, since a perfect animal model does not exist. Thus, the objective of this study was to standardize experimental models to investigate natural products with biological activity (NPBA) by using Wistar rats. The rat models were constituted to evaluate the acute and chronic antidiabetic and hypolipidemic effect of some NPBA. We observed that the Wistar rats showed the expected effect after the administration of acarbose, chitosan, insulin or orlistat, representing animal models for investigation of NPBA with antidiabetic and hypolipidemic potential. However, the response to simvastatin or ciprofibrate was different from that observed in humans. Thus, Wistar rats could be used in pharmacological screenings to evaluate NPBA with hypolipemic potential since it is taken into account this difference. In addition, alloxan-diabetic rats, in spite of partial reversion of diabetes, could be adequate experimental model to investigate NPBA with antidiabetic effects. However, a tendency to restore the normal serum lipids concentrations limits the use of alloxan-diabetic rats for evaluation of NPBA with hypolipidemic potential. Finally, the *Solanum melongena* and the *Cissus sicyoides*, used in our experiments did not show antidiabetic and hypolipidemic effect.

Keywords: Wistar rats; Experimental models; Antidiabetic activity; Hypolipidemic activity; Natural products.



## ABREVIATURAS

DM – Diabetes mellitus

STZ – Estreptozotocina

NOD – *nonobese diabetic* (camundongos diabéticos não obesos)

BB – *Bio-Breeding Laboratories*

PNBA – Produto natural biologicamente ativo

DAC – Doença aterosclerótica coronariana

PTEC – Proteína transferidora de éster de colesterol

HDL – *High-density lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)

LDL – *Low-density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)

VLDL – *Very low-density lipoprotein* (Lipoproteína de muito baixa densidade)

HMG-CoA redutase – Hidroximetil glutaril Coenzima A redutase

CS – *Cissus sicyoides*

SM – *Solanum melongena*

SM-H – *Solanum melongena* comercializada por Herbarium Laboratório Botânico

IG – intragástrica

IP – intraperitoneal

AM – amilose

CL – Clorpropamida

OSC – Óleo de soja cocamar<sup>®</sup>

DMSO – Dimetilsulfóxido

GB – Gordura Batavo<sup>®</sup>

TTG – Teste de tolerância à glicose

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Modelos Experimentais Empregando Animais .....	12
1.2 Ética no Uso do Modelo Experimental Animal .....	13
1.3 Escolha do Modelo Experimental Animal Adequado .....	14
1.4 Modelos Experimentais Animais Empregados na Investigação do Diabetes Mellitus (DM).....	17
1.4.1 Modelos Experimentais Animais em DM tipo 1 .....	18
1.4.2 Modelos Experimentais Animais em DM Tipo 2.....	22
1.5 Modelos Experimentais Animais para Estudos de Fármacos Hipolipemiantes.....	25
1.6 Modelos Experimentais Animais para Estudos Farmacológicos com PNBA .	31
1.7 Rato Wistar como Modelo Experimental em Estudos Farmacológicos.....	33
2. OBJETIVO.....	36
3. MATERIAL .....	37
3.1 Animais.....	37
3.2 Plantas.....	37
3.3 Fármacos e Reagentes Empregados .....	38
4. METODOLOGIA E RESULTADOS .....	39
4.1 Análises Bioquímicas.....	39
4.1.1 Determinação da concentração sérica de glicose .....	39
4.1.2 Determinação da concentração sérica de triacilglicerol .....	40
4.1.3 Determinação da concentração sérica de colesterol total .....	40
4.1.4 Determinação da concentração sérica de aspartato amino transferase (AST).....	41
4.1.5 Determinação da concentração sérica de alanina amino transferase (ALT) .....	42
4.2 Análise Estatística .....	42
4.3 Modelos experimentais animais para estudos de PNBA com potencial antidiabético.....	43
4.3.1 Modelo experimental para investigação de PNBA com o potencial de inibir a degradação de polissacarídeos.....	43
4.3.2 Modelo experimental para investigação de PNBA com o potencial de estimular a secreção de insulina.....	45
4.3.3 Modelo experimental para investigação de PNBA com o potencial de simular a ação da insulina sobre glicemia.....	46
4.3.4 Modelo experimental para investigação de PNBA com influência no teste oral e intraperitoneal de tolerância à glicose.....	48
4.3.5 Modelo experimental para investigação de PNBA com potencial antidiabético empregando ratos com Diabetes Mellitus (DM) induzido por aloxana.....	50
4.4 Modelos experimentais para estudos de PNBA com potencial hipolipemiante .....	53
4.4.1 Modelo experimental para investigação de PNBA com o potencial de alterar a absorção de gordura de origem animal.....	53

4.4.2 Modelo experimental para investigação de PNBA's com o potencial de alterar a absorção de gordura de origem vegetal.....	55
4.4.2.1 Empregando Quitosana (Reduical®).....	55
4.4.2.2 Empregando Orlistat (Xenical®).....	56
4.4.3 Modelo experimental para investigação de PNBA's com potencial hipolipemiante empregando ratos com Diabetes Mellitus (DM) induzido por aloxana.....	58
4.4.4. Modelo experimental para investigação de PNBA's com potencial hipolipemiante empregando ratos normais. ....	62
4.4.4.1 Usando Sinvastatina e Ciprofibrato como controles positivos. ....	62
4.4.4.2 Usando Sinvastatina em dose elevada como controle positivo. ....	64
4.5 Modelo Experimental para Estudo de Toxicidade Aguda de PNBA's.....	65
4.5.1 Modelo de experimento para avaliar a toxicidade aguda da SM-H, usando como padrão de toxicidade hepática o tetracloreto de carbono (CCl <sub>4</sub> ). ....	65
5. DISCUSSÃO .....	67
5.1 Modelos experimentais animais para estudos de PNBA's com potencial antidiabético.....	67
5.2 Modelos experimentais para estudos de PNBA's com potencial hipolipemiante .....	72
5.3 Modelo Experimental para Estudo de Toxicidade Aguda de PNBA's.....	80
6. CONCLUSÃO.....	82
7. BIBLIOGRAFIA .....	83

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 Modelos Experimentais Empregando Animais

Estudos pré-clínicos empregando animais de laboratório (ratos, camundongos, cães, coelhos etc.) como modelo experimental tem constituído um precioso instrumento para a compreensão e tratamento de um grande número de patologias humanas.

Investigações utilizando animais, provavelmente, tenham se iniciado com Hipócrates há mais de dois mil anos. Entretanto o primeiro trabalho científico empregando animais foi realizado por Willian Harvey e publicado em 1638, sob o título: *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Neste trabalho o autor apresentou os resultados obtidos em estudos experimentais sobre a fisiologia da circulação sanguínea em mais de 80 diferentes espécies animais (HARVEY, 1638 apud REICH, 1995). Desde então inúmeros trabalhos, empregando animais para estudos em favor da saúde humana, foram registrados. Assim, em meados do século XIX, Claude Bernard obteve hiperglicemia aguda em cães após punção do quarto ventrículo, demonstrando uma participação do sistema nervoso central na regulação da glicemia, o que foi posteriormente comprovado pelo grupo de Takeshi Shimazu da Universidade de Ehime (Japão) em estudos iniciados a partir dos anos 60 (SHIMAZU, 1983).

## 1.2 Ética no Uso do Modelo Experimental Animal

Inicialmente influenciados pelas idéias do filósofo francês René Descartes (1596-1650) sobre as diferenças entre homens e animais, os cientistas realizavam seus experimentos utilizando animais sem grandes preocupações. De acordo com este pensador os processos de pensamento e sensibilidade correspondem à alma, de onde deduziram os cientistas que, por serem desprovidos de uma “alma racional”, não havia possibilidade dos animais sentirem dor.

Já no final do século XVIII e início do século XIX apareceram as primeiras ações com relação à proteção animal. Em 1876, no Reino Unido, foi proposta a primeira lei regulamentando o uso de animais em pesquisa, através do *British Cruelty to Animal Act* e em 1909 surgiu a primeira publicação norte-americana sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação, proposta pela Associação Médica Americana (RAYMUNDO & GOLDIM, 2000).

Uma proposta precursora dos esforços em humanizar o emprego de animais como modelos experimentais, foi publicada no livro de RUSSEL & BURCH (1959), onde os autores estabeleceram os três “Rs” da pesquisa em animais: *Replace, Reduce and Refine*. Estas medidas visavam substituir, sempre que possível, o modelo animal, por técnicas alternativas, reduzir o número de exemplares utilizados e minimizar o sofrimento dos animais.

O movimento contra a viviseção animal tem crescido desde a década de 80, principalmente nos EUA e Europa, onde surgiram grupos radicais em defesa dos direitos animais. Este fato levou a Associação Mundial de Medicina a publicar uma declaração específica sobre o uso de animais em pesquisas biomédicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996).

No Brasil a primeira lei que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais em experimentos científicos, foi publicada em 1979, lei nº6.638 (BRASIL, 1979), mas nunca foi regulamentada. Já na Constituição da República Federativa do Brasil (BRASIL, 1988) a ação contra a crueldade com animais se tornou norma constitucional. Vários projetos de lei, visando regulamentar a experimentação animal, foram apresentados ao Congresso Nacional Brasileiro em 1996, entretanto até o início deste século nenhum deles havia sido aprovado.

Mesmo não havendo leis específicas em nosso país, existe entre os pesquisadores uma grande preocupação quanto aos cuidados com os animais utilizados em pesquisas. O COBEA, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, durante seu congresso em 1991, elaborou um código de ética que vem sendo amplamente divulgado entre os profissionais da área. Este código de ética é composto de diversos artigos que encerram em si três princípios básicos: sensibilidade, bom senso e boa ciência (KLOETZEL *et al.*, 1996; GOLDENBERG, 2000).

Do ponto de vista ético é de consenso entre os pesquisadores que os animais utilizados em pesquisas científicas devem ser tratados de forma adequada, sendo que o investigador tem o dever de evitar a dor e o sofrimento desnecessários.

### **1.3 Escolha do Modelo Experimental Animal Adequado**

Os modelos experimentais animais são imprescindíveis na compreensão da patofisiologia de determinada enfermidade bem como em testes terapêuticos visando a prevenção ou reversão do quadro patológico. Apesar de muitos estudos poderem ser conduzidos *in vitro*, como em linhagens celulares, os

modelos animais oferecem uma gama de possibilidades de estudos nutricionais e hormonais (MATHÉ, 1995).

Cada estudo deve ter o seu modelo experimental definido, já que não existe um modelo animal capaz de satisfazer os requerimentos necessários para esclarecer todas as hipóteses. Muitas doenças têm características únicas e o modelo animal deve representar tais características (MOGHADASIAN *et al.*, 2001; WEIDNER, 2002).

Durante a seleção de um modelo experimental animal deve-se avaliar a reprodutibilidade dos resultados, bem como se tal modelo mimetiza a doença humana que está sendo estudada. Em se tratando de ensaios farmacológicos é necessário escolher um modelo que seja sensível o suficiente para detectar mudanças significativas sem haver necessidade de se empregar grandes quantidades do composto a ser testado, principalmente quando este é de difícil obtenção.

Algumas espécies animais já foram descritas como sendo o modelo mais adequado para o estudo de determinadas doenças. Um exemplo é o chimpanzé, descrito por BARILE *et al.* (1987), como sendo o modelo animal recomendado para avaliação da patogenicidade de infecções por bactérias do gênero *Mycoplasma*, principalmente *M. pneumoniae*. O babuíno é um outro exemplo descrito de modelo animal ideal para investigações patofisiológicas, já que este animal tem diversas similaridades fisiológicas com o ser humano (DORMEHL *et al.*, 1992).

Ao se definir uma determinada espécie animal para empregar como modelo experimental, deve-se conhecer as características relacionadas com a doença ou função fisiológica que se pretende estudar. Por exemplo, em estudos

metabólicos onde se deseja avaliar alterações na concentração de determinados compostos, faz-se necessário conhecer o perfil bioquímico normal destes compostos na corrente sanguínea deste animal. Dentre os trabalhos onde podemos encontrar valores séricos referenciais bioquímicos e hematológicos para animais de laboratório, destaca-se o realizado por WOLFORD *et al.* (1986), que apresenta valores obtidos com mais de 3000 animais.

Para o desenvolvimento de experimentos com animais existem, já referendados na literatura, modelos que desenvolvem espontaneamente a doença a ser estudada, como é o caso dos camundongos diabéticos não obesos (NOD – *nonobese diabetic mouse*) e ratos BB (*Bio-Breeding Laboratories*), usados em estudos sobre diabetes (BUSCHARD, 1996; GREINER *et al.*; 2001); Além desses, existem modelos animais que desenvolvem a doença a partir de um estímulo externo, como dieta alterada (KRAUSE *et al.*, 1996; DIXON *et al.*, 1999), uso de produtos químicos (CETTO *et al.*, 2000; KAMESWARA *et al.*, 2001) ou infecção por um determinado microrganismo (CRAIG, 1993; O'REILLY *et al.*, 1996; WEIDNER, 2002).

Um terceiro tipo de modelo experimental, atualmente empregado, utiliza animais modificados geneticamente. Estes modelos, cada vez mais específicos, vêm sendo criados a uma velocidade impressionante (KRAUSE & PRINCEN, 1998; MOGHADASIAN *et al.*, 2001). Animais transgênicos, diferentes dos testes *in vitro*, podem providenciar condições para se avaliar sítios específicos em vias sinalizadoras hormonais e metabólicas sob condições fisiológicas (LEVINGSTON, 1999) ou ainda podem expressar certas moléculas de forma alterada, estabelecendo modelos de determinadas doenças (EYNON & FLAVELL, 1999).



#### **1.4 Modelos Experimentais Animais Empregados na Investigação do Diabetes Mellitus (DM)**

Diabetes mellitus (DM) é um problema de saúde pública de abrangência mundial. No Brasil estima-se que existem mais de 5 milhões de pessoas com DM (MARCONDES *et al.*, 2001). O mais agravante é a relação entre o diabetes e o risco de desenvolvimento de doença cardiovascular, já que este risco é 2 a 6 vezes maior no diabético (DIXON *et al.*, 1999).

Apesar de existirem inúmeros estudos em relação à doença, a complexidade da patologia dificulta o seu completo entendimento. Estudos em modelos animais têm contribuído grandemente para o entendimento da etiologia, patogenia e tratamento do diabetes (GOTTLIEB & EISENBARTH, 1996; LEIBOWITZ *et al.*, 2002; MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2002; NYARKO *et al.*, 2002).

Estabelecer uma correlação entre a doença diabética no animal e no ser humano constitui outro grande desafio (BUSCHARD, 1998; LOHMANN, 1998; GREINER *et al.*, 2001), já que nenhum modelo animal tem características similares às daquelas da doença humana e o exato mecanismo do modelo animal diabético não é completamente entendido. Portanto a seleção cuidadosa do modelo animal a ser empregado, uma caracterização adequada do animal estudado, uma correta correlação e interpretação dos resultados são críticos para o investigador (MATHÉ, 1995; CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997).

Os modelos animais para o estudo do DM são obtidos através de linhagens selecionadas, destruição química das células  $\beta$  pancreáticas, dietas enriquecidas com carboidratos (CHETA, 1998) ou ainda através da manipulação genética (JOSHI *et al.*, 1997).

Como o DM tem sido classificado em tipo 1 e tipo 2, existem na literatura vários modelos descritos e alguns bastante empregados, para diversos estudos, inclusive farmacológicos, em cada tipo desta doença.

#### **1.4.1 Modelos Experimentais Animais em DM tipo 1**

DM tipo 1 é decorrente de uma desordem auto-imune, pouco entendida, não prevenível e irreversível, sendo a insulina a base do tratamento destes pacientes. Segundo BUSCHARD (1998), apesar das questões de natureza ética quanto ao uso de animais para estudos relacionados ao DM tipo 1, a gravidade da doença justifica este uso.

Um dos modelos animais utilizados para o estudo desta doença é obtido através da destruição química das células  $\beta$ -pancreáticas por aloxana ou estreptozotocina (STZ). A ação destas citotoxinas acontece principalmente sobre as células  $\beta$  devido à analogia estrutural entre estas toxinas e a molécula de glicose, o que permite o fácil transporte destes compostos para dentro das células (MATHÉ, 1995).

A aloxana modifica a permeabilidade das células  $\beta$  e os efeitos tóxicos estão intimamente ligados à formação de radicais livres. As células  $\beta$  possuem em suas membranas plasmáticas numerosos grupos SH e têm baixa capacidade para destruir radicais livres. Entretanto o exato mecanismo de destruição destas células ainda não está completamente elucidado. A aloxana atua como diabetogênico em ratos, camundongos, coelhos, cães, hamsters, carneiros e macacos, mas o cobaio é resistente a ação desta droga. Pode ser administrada por todas as vias, inclusive a

oral, mas devida a sua curta meia vida (menos de 1 minuto), a infusão direta na artéria pancreática tem dado melhores resultados (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997).

O tratamento com aloxana resulta em um perfil trifásico dos níveis de glicose sanguínea em animais não submetidos ao jejum. Inicialmente se observa uma marcante hiperglicemia de curta duração, seguida por uma hipoglicemia, também de curta duração e finalmente estabelece-se o quadro de constante hiperglicemia. Os animais tratados com aloxana podem atingir um quadro grave de cetoacidose requerendo insulina para sobreviver. Entretanto ratos e camundongos podem apresentar remissão espontânea (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997).

Por outro lado, a STZ é um antibiótico de largo espectro que induz diabetes em praticamente todas as espécies animais. A dose diabetogênica varia com a espécie (50-200 mg/Kg). Devido a sua meia vida de 5 minutos em camundongo, a injeção intravenosa parece ser a melhor via de administração (RERUP, 1970).

O tratamento com STZ resulta no mesmo perfil trifásico observado com a aloxana. Diferentes mecanismos de ação da STZ sobre as células  $\beta$  têm sido propostos, mas sua ação principal também parece estar ligada a geração de radicais livres (MATHÉ, 1995).

Relatos sobre recuperação espontânea de animais tratados com STZ são conflitantes (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997) e apesar dos animais desenvolverem importante hiperglicemia, não requerem tratamento com insulina para sobreviver, providenciando modelos de estudos dos efeitos metabólicos da deficiência de insulina (MATHÉ, 1995).

Além da STZ e aloxana, outras substâncias já foram utilizadas para induzir aumento nos níveis séricos de glicose em animais de laboratório, como o

lítio, que tem mostrado uma ação inibidora da liberação de insulina estimulada pela glicose em ratos (SHAH & PISHDAD, 1980).

A ciclosporina A também já foi descrita como responsável pelo aumento dos níveis de glicose sanguínea em cães e em diversas linhagens de ratos (POLLOCK *et al.*, 1991).

Animais com diabetes quimicamente induzido são freqüentemente utilizados em estudos farmacológicos ou para desenvolvimento de novas drogas, inclusive fitoterápicos, empregados no tratamento desta doença (SARKAR *et al.*, 1996; CETTO *et al.*, 2000; RAO *et al.*, 2001; PEPATO *et al.*, 2001).

Além dos modelos quimicamente criados, outros são comumente empregados em estudos sobre o tratamento do DM tipo 1, como o rato BB e camundongo NOD, que desenvolvem espontaneamente diabetes (WONG & JANEWAY, 1999).

O rato BB, reconhecido em 1974 no Canadá, desenvolve diabetes principalmente entre os 60 e 120 dias de vida. Os animais mais jovens desenvolvem um quadro grave da doença e podem morrer se não forem tratados com insulina, enquanto os ratos mais velhos apresentam um quadro menos dramático (BUSCHARD, 1996).

O camundongo NOD surgiu em 1980 no Japão (MAKINO *et al.*, 1980) e o aparecimento da doença neste animal acontece entre 80 e 200 dias após o nascimento, principalmente na fêmea (aproximadamente 90%), sendo o macho menos propenso (10 – 60%) à doença (GREINER *et al.*, 2001). MAKINO *et al.* (1981) demonstraram a importância dos hormônios sexuais gonadais como moduladores do desenvolvimento da doença nesta linhagem.

Os modelos animais de desenvolvimento espontâneo de diabetes são principalmente empregados para estudo sobre a origem imunológica do DM tipo 1 (CARNAUD, 1995; GOTTLIEB & EISENBARTH, 1996). Entretanto alguns autores os têm empregado para avaliar o efeito preventivo de algumas drogas no surgimento desta doença (FEDERLIN & BECKER, 1990; SOBEL *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 1999; SOBEL *et al.*, 2000). RABINOVITCH (1998), observou que a administração sistêmica de uma ampla variedade de citocinas pode prevenir o desenvolvimento de DM tipo 1 em camundongos NODs e em ratos BBs, entretanto este efeito preventivo depende da dose e frequência de administração, além da idade do animal.

Quanto ao emprego de camundongos NODs e ratos BBs na avaliação da ação de produtos naturais biologicamente ativos (PNBAs) sobre esta doença, podemos encontrar estudos relacionados à dieta a base de produtos naturais, usadas para prevenir o surgimento da doença. O estudo de HOOFFAR *et al.* (1992), é um exemplo deste emprego, onde os autores demonstram que o uso de óleo de soja ou óleo de peixe na dieta, não aumenta as chances de desenvolvimento de diabetes em ratos BB, mas uma dieta à base de caseína, ou seja, de grande conteúdo protéico, inibe significativamente o desenvolvimento da doença, neste modelo animal.

Diversos animais com alterações específicas em um ou mais genes têm sido desenvolvidos como modelos de DM do tipo 1. Atualmente a tecnologia transgênica permite examinar o papel de importantes auto-antígenos no desenvolvimento desta doença (EYNON & FLAVELL, 1999). Como exemplo podemos citar os camundongos BDC2.5 TCR-transgênicos, nos quais as células T respondem para um antígeno granular das ilhotas pancreáticas. Um segundo exemplo pode ser o camundongo NOD com uma mutação gênica que o torna capaz

de expressar grande quantidade de GAD-65 (ácido glutâmico descarboxilase, um importante auto-antígeno em humanos) em todos os tecidos. Normalmente os camundongos NODs expressam baixas quantidades de GAD-65 no pâncreas (WONG & JANEWAY, 1999).

Modelos animais transgênicos são geralmente empregados em estudos ligados à patogenia do DM tipo 1. O emprego destes animais em estudos de desenvolvimento de drogas voltadas para o tratamento e ou prevenção desta doença ainda é limitado.

Existem ainda os modelos animais para estudos relacionados ao diabetes induzidos através de infecção viral. Esta indução depende do tipo de vírus e da linhagem de camundongo empregada. O vírus EMC (encefalomiocardite) é amplamente utilizado e enquanto as linhagens de camundongos C3H/J, SJL/J, SWR/J, DBA/1J e DBA/2J são suscetíveis e desenvolvem diabetes, as linhagens C57BL/6J, CBA/J e AKR/J são resistentes (BUSCHARD, 1996).

#### **1.4.2 Modelos Experimentais Animais em DM Tipo 2**

Os modelos animais empregados em estudos de DM tipo 2 são limitados (JOSHI *et al.*, 1997), pois devem exibir uma inter-relação entre resistência à insulina e função de células  $\beta$  comprometida. Tais modelos podem ser obtidos de diferentes formas, como por exemplo, através da injeção de STZ em ratos neonatos BONNER-WEIR *et al.* (1981). PORTHA *et al.* (1979) trabalhando com ratos Wistar injetados com STZ dentro das primeiras 48 horas de nascimento, conseguiram modelos de DM tipo 2, baseados principalmente na deficiência das células  $\beta$ . Entretanto, BLONDEL *et al.* (1989), conseguiram modelos apresentando importante

deficiência das células  $\beta$  e reduzida resposta à insulina no fígado e tecidos periféricos. BLONDEL & PORTHA (1989), demonstraram que ratos tratados com STZ quando adultos, após nove dias de tratamento desenvolvem uma resistência à insulina, primeiro no fígado e mais tarde nos tecidos periféricos.

Outra forma para obtenção de modelos animais de DM tipo 2 é a modificação genética. O rato Zucker é um exemplo de animal mutante, que possui o gene *fatty* (*fa*) responsável pelas alterações características desta linhagem (ZUCKER & ZUCKER, 1961). Ratos Zucker homozigotos (*fa/fa*) são caracterizados por possuírem hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperfagia, intolerância à glicose e hipersecreção de insulina após ingestão de glicose, baixa secreção de glucagon, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, sendo considerados importantes modelos para DM tipo 2, dislipidemia e obesidade (MATHÉ, 1995). Um outro exemplo de modelo mutante é o rato JCR:LA cp, cujo gene mutante (*cp*), foi selecionado por KOLETSKY (1973). Estes animais, quando homozigotos (*cp/cp*), são obesos, hiperlipidêmicos, hiperglicêmicos, hiperinsulinêmicos e com resistência à insulina, compondo interessantes modelos para estudos relacionados a doenças cardiovasculares, já que os machos homozigotos desenvolvem espontaneamente lesões cardiovasculares.

Estudos farmacológicos empregando ratos selecionados geneticamente, como o Zucker, são freqüentemente realizados na tentativa de desenvolvimento de novas drogas para uso em pacientes com DM tipo 2 (POSPISILIK *et al.*, 2002; CLINE *et al.*, 2002; CHAKRABARTI *et al.*, 2002a).

A seleção genética também permite o desenvolvimento de linhagens de camundongos como modelos para DM tipo 2. São exemplos os camundongos db/db, ob/ob, NZO, KK, etc (MATHÉ, 1995). Estes camundongos representam

importantes modelos de DM para estudos farmacológicos (CARNEY *et al.*, 2002; ROLIN *et al.*, 2002), incluindo ensaios envolvendo plantas com possíveis efeitos antidiabéticos (PALIT *et al.*, 1999; ATTELE *et al.*, 2002). Por exemplo, CHAKRABARTI *et al.*, (2002b) trabalhou com camundongos diabéticos insulino-resistentes C57BL/KsJ-db/db e outros animais, para averiguação de um provável efeito antidiabético e hipolipemiante do extrato obtido da raiz da *Helicteres isora*, planta utilizada como antidiabético por alguns grupos étnicos indianos.

Outro modelo animal para DM tipo 2 pode ser o rato da areia (*Psammomys obesus*), o qual apresenta uma diferente sensibilidade à dieta. Quando alimentado com uma dieta natural, vegetariana, estes animais são normoglicêmicos e quando alimentados com ração para ratos de laboratório, tornam-se obesos, desenvolvem hiperglicemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina, além de hiperlipidemia. Quando os ratos de areia recebem dieta rica em colesterol e são suplementados com drogas empregadas no tratamento do hipertireoidismo, desenvolvem lesões cardiovasculares, constituindo interessante modelo para estudos de aterosclerose ligadas a DM tipo 2 (MATHÉ, 1995).

Sendo o DM tipo 2 uma síndrome muito complexa, é de se esperar que defeitos em diferentes genes conduziram ao grande espectro de patofisiologias observado nesta doença. A existência de uma ampla variedade de genes envolvidos no mecanismo de ação da insulina e no funcionamento das células  $\beta$  permitiu o desenvolvimento de animais, mais precisamente, camundongos modificados geneticamente, nos quais os efeitos de expressões alteradas de um simples gene ou um conjunto de genes (camundongos transgênicos) ou ainda, efeitos de eliminação de um determinado gene (camundongos *knockouts*) podem ser estudados (JOSHI *et al.*, 1997). Dependendo de qual gene é alterado, ou seja, qual é a importância de



seu produto (proteína) na cascata sinalizadora da insulina, pode-se criar modelos animais com vários graus de resistência à insulina. Por exemplo, quando uma recombinação homóloga é aplicada para o gene do receptor de insulina (IR), 10% dos camundongos *knockouts* heterozigotos desenvolvem diabetes, enquanto os homozigotos morrem na primeira semana de cetoacidose diabética. Já alterações no IRS-1 de camundongos não conduz ao diabetes (MAUVAIS-JARVIS *et al.*, 2002).

Modelos transgênicos de DM tipo 2 estão sendo empregados em estudos farmacológicos, realizados principalmente, na tentativa de esclarecer o mecanismo (ou mecanismos), de ação das drogas testadas (SANCHEZ *et al.*, 2002).

### **1.5 Modelos Experimentais Animais para Estudos de Fármacos Hipolipemiantes**

Os modelos animais mostram-se muito importantes na avaliação do tratamento da dislipidemia e doenças relacionadas (MOGHADASIAN, 2002). Entretanto definir o modelo animal e principalmente, a espécie animal a ser empregada tem sido um grande problema para os pesquisadores. Existem diversas espécies que mimetizam várias funções metabólicas humanas, mas certas drogas que diminuem lípides no homem, são inativas ou pouco toleradas por estas espécies animais (KRAUSE & PRINCEN, 1998).

O modelo animal ideal para dislipidemia humana e aterosclerose devem compartilhar com o homem a patofisiologia da doença, inclusive características da placa aterosclerótica (MOGHADASIAN *et al.*, 2001).

O rato e o camundongo têm sido, desde longa data, empregados em estudos sobre doença aterosclerótica coronariana (DAC), inclusive com respeito ao tratamento ou desenvolvimento de novos compostos que atuem sobre os níveis séricos de colesterol e triglicérides (DAY *et al.*, 1978; KRAUSE & PRINCEN, 1998).

Entretanto ratos e camundongos, diferente dos humanos e de várias outras espécies animais, não possuem, no plasma, a proteína transferidora de éster de colesterol (PTEC) e conseqüentemente aproximadamente 70% a 80% do colesterol plasmático total é encontrado como lipoproteína de alta densidade (HDL – *High-Density Lipoprotein*). Esta característica talvez seja a responsável pela alta resistência destes animais a aterosclerose (DAY *et al.*, 1978; MOGHADASIAN *et al.*, 2001).

Os inibidores da hidroximetil glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), representados pelas estatinas, são utilizados em humanos como agentes hipocolesterolêmicos. Estes compostos ao invés de diminuir o colesterol sérico em ratos alimentados com ração normal (sem qualquer suplemento), diminuem os níveis de triacilglicerol plasmáticos; além disso, são inativos em ratos suplementados com colesterol (FUJIOKA *et al.*, 1995). Apesar destes compostos serem capazes de inibir a síntese de colesterol no fígado de ratos, o efeito hipocolesterolêmico não é observado. Como os ratos possuem pouca ou nenhuma lipoproteína de baixa densidade (LDL – *Low-Density Lipoprotein*), os inibidores de HMG-CoA redutase afetam a produção e secreção de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL - *Very Low-Density Lipoprotein*), as quais, por serem ricas em triacilglicerol, levam a diminuição destes últimos no plasma. A inibição da síntese de colesterol no fígado do rato aumenta a degradação de apolipoproteína B (Apo B), contribuindo para a diminuição de produção de VLDL (KRAUSE & PRINCEN, 1998).

Segundo KRAUSE *et al.* (1996) e BISGAIER *et al.* (1998), os ratos não deveriam ser empregados como modelos para estudos farmacológicos objetivando a modificação dos níveis de LDL. Porém, poderiam ser empregados na pesquisa de compostos que elevassem os níveis plasmáticos de HDL.

Entretanto é freqüente o emprego de ratos sob dieta normal ou suplementada, principalmente com colesterol, em testes de triagem de fármacos com possíveis efeitos hipolipidêmicos (AUGUSTI *et al.*, 2001; SALIL & RAJAMOHAN, 2001; ANILA & VIJAYALAKSHMI, 2002; LIU *et al.*, 2002; GORINSTEIN *et al.*, 2002). Ratos alimentados com dietas ricas em sacarose desenvolvem uma hipertrigliceridemia, providenciando um modelo de hipertrigliceridemia endógena sem obesidade, que também podem ser empregados em estudos farmacológicos (KRAUSE & NEWTON, 1995; KRAUSE *et al.*, 1996).

Os derivados de ácido fibríco (fibratos) também atuam de modo diferente no homem e no rato. No homem os fibratos são utilizados para diminuir os níveis sanguíneos de triacilglicerol (BREUER, 2001), mas segundo KRAUSE & PRINCEN (1998), o rato é o único modelo animal onde o fibrato diminui os níveis plasmáticos de colesterol, em doses semelhantes às empregadas em humanos. Estes autores observaram também que o efeito hipocolesterolêmico dos fibratos é maior em ratos machos que em fêmeas, depende do estado nutricional (alimentado ou em jejum) do animal no momento da avaliação, do tipo de dieta empregada na alimentação (ração comum ou suplementada com colesterol) e do tipo de derivado do ácido fibríco administrado.

Segundo MOGHADASIAN *et al.* (2001), o uso de camundongos em ensaios experimentais de aterogênese é limitado. Por outro lado, o desenvolvimento de diversas linhagens de camundongos transgênicos, providencia modelos para estudo de interações, de um ou mais genes e fatores externos, na patogenia da DAC. Além de oferecerem melhor preditibilidade das respostas humanas a futuras drogas hipolipemiantes (KRAUSE & PRINCEN, 1998).

Estudos com camundongos transgênicos para avaliação de drogas hipolipemiantes surgiram no início da década passada e os dados disponíveis são limitados (KRAUSE & PRINCEN, 1998). Entretanto neste início de milênio já podemos encontrar diversos exemplos destes estudos, como o trabalho de DRAIJER *et al.* (2002), que emprega camundongos deficientes em receptor LDL, homozigotos (LDLR0/0) e heterozigotos (LDLR+/0), para averiguar o mecanismo de ação de um potente agente hipolipidêmico. O trabalho de VOLGER *et al.* (2001), com camundongo ApoE\*3-Leiden pode ser um exemplo do uso destes animais também na procura de fitofármacos.

Coelhos compartilham com o homem diversas semelhanças no metabolismo lipídico, como por exemplo: a presença de lipoproteínas com Apo B, produção de VLDL com Apo B<sub>100</sub> pelo fígado, atividade de PTEC plasmática e alta taxa de absorção de colesterol da dieta. Entretanto diferente dos homens, o coelho não possui lipase hepática nem Apo A-II (MOGHADASIAN *et al.*, 2001). Além das semelhanças metabólicas, o coelho alimentado com uma dieta aterogênica (rica em colesterol) desenvolve hipercolesterolemia e lesões ateroscleróticas semelhantes aos humanos (YANG *et al.*, 1998). Estes fatores elevam a posição do coelho na escala de modelos para estudos de controle das dislipidemias.

Em coelhos os inibidores da HMG-CoA redutase diminuem o colesterol, inclusive em animais alimentados com dieta suplementada com colesterol, enquanto os fibratos não mostram efeito sobre os níveis de colesterol plasmático (KRAUSE & PRINCEN, 1998) e apenas doses muito elevadas são suficientes para reduzir a trigliceridemia através de um aumento de receptores para VLDL nos tecidos periféricos (MATSUOKA *et al.*, 1996).

Coelhos NZW (*New Zeland White*) representam uma linhagem de coelhos normais, mundialmente utilizados em diversos estudos, inclusive para o desenvolvimento de novos fármacos, como pode exemplificar o trabalho de LOPES *et al.* (2001). Estes autores administraram diferentes doses do flavonóide rutina em machos e fêmeas desta linhagem, para investigar seu efeito sobre os níveis de colesterol total, HDL e triacilgliceróis. Coelhos WHHL (*Watanabe Heritable Hyperlipidemic*) representam modelos de metabolismo lipídico espontaneamente alterado e são comumente empregados em estudos visando o controle da aterosclerose (PAULETTO *et al.*, 2000; DJAHANSOUZI *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2002).

Também estão disponíveis como modelos experimentais, coelhos transgênicos com alterações no metabolismo lipídico, tais como os NZW com Apo B<sub>100</sub> humana, que apresentam níveis de triglicérides e colesterol 2 a 3 vezes acima do normal. Os coelhos WHHL expressando Apo A-I ou a enzima LCAT (lecitina colesterol acil-transferase) humanas constituem outro importante exemplo, dentre vários, do emprego de coelhos transgênicos no entendimento da patogênese da aterosclerose e dislipidemia humana (MOGHADASIAN *et al.*, 2001).

Uma outra espécie, o hamster, tem similaridades metabólicas com os demais roedores, já que HDL é a sua principal lipoproteína carreadora de colesterol, mas também tem semelhanças com humanos na regulação dos receptores de LDL e a presença de PTEC (MATHÉ, 1995). Os inibidores da HMG-CoA redutase são pouco tolerados pelos hamsters e podem causar toxicidade hepática, sendo esta espécie pouco empregada para estudos farmacológicos com estas drogas (KRAUSE & PRINCEN, 1998).

Além dos roedores, diversas outras espécies podem constituir modelos animais de estudo para fármacos hipolipidêmicos, com ou sem ação anti-aterosclerótica. O pombo é um representante das aves, que por ser naturalmente hipercolesterolêmico pode ser facilmente empregado nestes estudos (St CLAIR, 1983). A linhagem White Carneau desenvolve aterosclerose, com diversas similaridades à doença humana, mesmo quando alimentada com dieta comum, à base de grãos, constituindo, segundo MOGHADASIAN *et al.* (2001), um dos melhores modelos para estudo da DAC humana.

Os suínos, por apresentarem, segundo DOUGLAS (1972 apud DIXON *et al.*, 1999), um sistema cardiovascular semelhante ao do homem, também são importantes para os estudos de DACs. Os porcos são facilmente induzidos a graves lesões ateroscleróticas, em diversas artérias, através de dieta rica em colesterol (MOGHADASIAN *et al.*, 2001). DIXON *et al.* (1999) trabalharam com porcos diabéticos, cujas células  $\beta$ -pancreáticas foram destruídas com aloxana para constituírem modelo de estudo de dislipidemia observada no DM tipo 1 e tipo 2.

Apesar de apresentarem uma maior resistência ao desenvolvimento de aterosclerose induzida por dieta e raramente desenvolver espontaneamente lesão aterosclerótica, os cães têm sido empregados em alguns estudos farmacológicos relacionados a drogas hipolipidêmicas (RUDEL, 2002). Dietas com alto teor de gordura e colesterol podem induzir cães a graves lesões ateroscleróticas, como também podem conduzir, a mesma espécie animal, a apenas uma elevação nos níveis de colesterol sanguíneo (MOGHADASIAN *et al.*, 2001).

Os macacos podem desenvolver aterosclerose com características semelhante aquelas observadas no ser humano (DAY *et al.*, 1978), entretanto, segundo MOGHADASIAN *et al.* (2001) a variabilidade das lesões ateroscleróticas

entre as espécies, o alto custo, baixa disponibilidade de animais, dificuldade de manipulação e questões éticas limitam o uso destes animais nos estudos do metabolismo lipídico e desenvolvimento da aterosclerose. Apesar das dificuldades, alguns pesquisadores têm empregado esta espécie animal como modelo experimental em aterosclerose, como DAY *et al.* (1978), que utilizaram, com sucesso, macacos da espécie *Macaca fascicularis*, para testes de triagem secundários de agentes modificadores dos níveis de lipoproteínas e anti-ateroscleróticos.

### **1.6 Modelos Experimentais Animais para Estudos Farmacológicos com PNBAs**

Estudos em animais são importantes para o desenvolvimento de novos fármacos, pois estudos pré-clínicos realizados em diferentes espécies animais são requisitos imprescindíveis na validação de drogas. Quando se pesquisa as propriedades terapêuticas de PNBAs, inclusive plantas, os testes *in vivo*, utilizando animais, constituem ferramenta de igual importância, principalmente por ser esta uma área carente de estudos científicos.

A maioria das plantas empregadas na medicina popular não foi investigada cientificamente ou os seus efeitos terapêuticos ainda não estão completamente comprovados ou entendidos. Existem muitos exemplos de plantas ou produtos vegetais com possíveis ações hipolipidêmicas ou antidiabéticas, necessitando estudos para comprovação.

No que se refere às plantas com potencial antidiabético, podemos citar o *Cissus sicyoides* L. (CS), um arbusto da família *Vitaceae* que no México é empregado popularmente como analgésico e antiinflamatório. No Brasil é conhecido popularmente como “insulina”, entretanto existem relatos na literatura favoráveis

(PEPATO *et al.*, 2003) e desfavoráveis (BELTRAME *et al.*, 2001) a seu possível efeito antidiabético. Outro exemplo seria o ginseng, uma planta com propriedades adaptógenas (que pode aumentar a resistência em situações adversas como estresse e infecções), que também tem sido empregada popularmente no tratamento do DM. Apesar de existirem uma grande variedade de produtos conhecidos como ginseng, somente o asiático ou coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer) e o americano (*Panax quinquefolius* L.) foram estudados (KIMURA *et al.*, 1981; OHNISHI *et al.*, 1996; YUAN *et al.*, 1998; ATTELE *et al.*, 2002), quanto aos efeitos antidiabéticos, em experimentos utilizando animais.

Entre os vegetais empregados, em medicina popular, para o tratamento das dislipidemias, se pode citar a *Solanum melongena* L. (SM), conhecida como berinjela, que possui em seu favor estudos sugerindo efeito hipolipemiante em humanos (GUIMARÃES *et al.*, 2000), coelhos (JORGE *et al.*, 1998) e ratos (SUDHEESH *et al.*, 1997). SUDHEESH *et al.* (1999), em outro trabalho com ratos, verificou o efeito antioxidante de flavonóides isolados da SM, atribuindo um possível uso desta planta no combate à aterosclerose.

Inúmeros pesquisadores têm trabalhado com animais experimentais das mais diversas espécies em estudos farmacológicos de produtos vegetais e seus derivados. Este fato pode ser constatado ao se observar os trabalhos publicados no *Journal of Ethnopharmacology*, um jornal oficial da Sociedade Internacional de Etnofarmacologia, de periodicidade mensal, dedicado a publicações de estudos envolvendo atividades biológicas de derivados de plantas e animais usados na medicina tradicional de culturas passadas e presentes. Em um levantamento realizado neste periódico entre setembro de 2001 e agosto de 2002, pôde-se constatar que dos 216 trabalhos publicados, 106 foram ensaios com plantas



medicinais realizados em modelos animais de experimentação. Dentre estes estudos, 12 foram para avaliar a atividade antidiabética, um para avaliar os possíveis efeitos hipolipemiantes e outro para investigar estes dois efeitos para uma mesma planta.

### **1.7 Rato Wistar como Modelo Experimental em Estudos Farmacológicos**

Apesar da existência de inúmeros modelos experimentais, constituídos das mais variadas espécies animais, o rato (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar tem aplicação em diferentes áreas da pesquisa científica. Provavelmente por ser uma linhagem de ratos de fácil obtenção e manutenção, além do baixo custo.

O rato Wistar é originário do Instituto Wistar, um órgão fundado em 1892, por Caspar Wistar, um médico americano, preocupado com o futuro da pesquisa na área médica. Vários foram os seguidores do Dr Wistar e em 1906, sob a liderança de Milton Greenman e Henry Donaldson, o instituto Wistar criou o “*WISTARAT*”, o primeiro animal de laboratório padronizado.

Hoje acredita-se que mais da metade dos ratos de laboratório empregados em pesquisa são descendentes do “*WISTARAT*”. No levantamento que realizamos entre setembro de 2001 e agosto de 2002, no *Journal of Ethnopharmacology*, citado anteriormente, dos 106 estudos envolvendo plantas e animais de experimentação, 57% empregaram ratos e destes, 60% empregaram ratos Wistar, mostrando desta forma, que esta linhagem é amplamente usada em estudos farmacológicos, inclusive os relacionados a plantas medicinais.

Estes animais podem ser empregados diretamente, no estado normal, em estudos farmacológicos (FUJIOKA *et al*, 1995) ou submetidos a determinados

tratamentos químicos, físicos ou comportamentais, para constituir interessantes modelos de estudos específicos.

O tratamento com aloxana ou STZ conduz o rato Wistar a uma degeneração das células  $\beta$  pancreáticas, variável em intensidade, tornando-os desta forma modelos para estudos de fármacos antidiabéticos. Estes modelos são comumente empregados na pesquisa de plantas ou seus derivados com possível ação antidiabética (SHARMA *et al.*, 1997; PEPATO *et al.*, 2001; CETTO *et al.*, 2000).

Quando tratados com Triton WR-1339, também conhecido como Tyloxapol, um detergente aniônico de estrutura polimérica, os ratos desenvolvem um quadro de hiperlipidemia e são empregados, por alguns pesquisadores, em testes de agentes com possíveis efeitos hipolipidêmicos. HORAK *et al.* (2000) utilizaram ratos Wistar tratados com Triton para averiguar os efeitos do Zopiclone, uma ciclopirona que atua em receptor benzodiazepínico central, sobre a glicemia e lipidemia. Os autores observaram uma redução na concentração sérica de glicose, colesterol, triglicérides e lípidos totais, nos animais tratados com Zopiclone. Este modelo de hiperlipidemia induzida quimicamente, também já foi usado em estudos de fármacos, com potencial hipolipemiante, de origem vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2002a; OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

O uso de dieta suplementada pode induzir o rato Wistar a constituir modelo experimental de alterações séricas de lipídeos. PÉREZ *et al.* (1999) alimentaram fêmeas Wistar com uma emulsão rica em triacilglicerol de cadeia longa por 4 meses e obtiveram um modelo de hiperlipidemia e obesidade, passível de ser empregado em investigações da patogenia da aterosclerose e do tratamento da obesidade e dislipidemia. RASEKH *et al.* (2001), empregaram ratos Wistar diabetizados com STZ e alimentados com dieta suplementada com colesterol, para

investigação do efeito hipolipidêmico do extrato aquoso das partes aéreas do *Teucrium polium*, uma planta da família *Lamiaceae*, usada popularmente como antiinflamatória, antibacteriana e anti-hipertensiva.

Neste início do século XXI, no qual a pesquisa científica tende cada vez mais a empregar técnicas de biologia molecular na investigação de fenômenos biológicos e a utilização de animais de laboratório passa a ser cada vez mais questionada pelos movimentos antiviseccionistas, uma questão é suscitada: a utilização de animais de laboratório ainda constitui uma ferramenta experimental válida no contexto científico e tecnológico que vivemos?

Diante da extensão do tema, nos restringiremos a abordar apenas “uma fração” do mesmo, ou seja, o emprego de ratos da linhagem Wistar através de estudos *in vivo* na investigação de PNBA com potencial antidiabético e hipolipemiante.

Pretendemos através deste trabalho não apenas responder a esta questão, mas apresentar uma visão geral de nossa experiência no emprego de ratos da linhagem Wistar. Além disso, entendemos que a experiência acumulada por nosso laboratório, neste campo de investigação, poderá contribuir com aqueles que pretendem utilizar o rato Wistar como modelo experimental em estudos *in vivo* na investigação de PNBA com potencial antidiabético e hipolipemiante.

## **2. OBJETIVO**

Padronizar ensaios farmacológicos empregando ratos Wistar, para investigação de PNBA's com potenciais antidiabético e hipolipemiante.

### 3. MATERIAL

#### 3.1 Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, com peso entre 200 e 250g. Os animais, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, foram mantidos em gaiolas de polipropileno, no biotério experimental do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Farmácia e Farmacologia desta Universidade. A alimentação foi à base de ração balanceada (Nuvital<sup>®</sup>), oferecida *ad libitum*. Na maioria dos estudos a ração foi retirada na véspera do experimento, de maneira que no momento da coleta de sangue os animais encontravam-se em jejum.

#### 3.2 Plantas

O extrato aquoso de *Cissus sicyoides* (CS) foi empregado na forma de pó, o qual foi preparado pelo Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia e Farmacologia (DFF) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para uma perfeita solubilidade, visando administração via intraperitoneal, o extrato foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, SIGMA D-5879) e quando da administração oral foi dissolvido em salina.

A *Solanum melongena* (SM-H), foi empregada como extrato seco de berinjela, comercializado em forma de cápsula pelo Herbarium Laboratório Botânico LTDA (Lote 525391), dissolvido em água.

### 3.3 Fármacos e Reagentes Empregados

Amilose P.A. (Laboratório ISOFAR); Glicose Anidra P.A. (Indústrias químicas VETEC) e Sinvastatina (HEXAL, lote: 8283) foram empregadas na forma de pó e diluídas em água. Aloxana (SIGMA A-7413) foi preparada em solução salina fisiológica.

Clorpropamida (Diabinese<sup>®</sup>-PFIZER); Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>-BAYER); Orlistat (Xenical<sup>®</sup>-ROCHE); Quitosana (Reducal<sup>®</sup>-Laboratório Herbarium Ltda) e Ciprofibrato (Oroxadin<sup>®</sup>-SANOFI) foram empregados na forma de pó, obtido da trituração dos comprimidos, diluídos em água, levando-se em conta a concentração do princípio ativo presente na formulação farmacêutica. Insulina regular humana (BIOBRÁS<sup>®</sup>) e solução de glicose 50% (ARISTON<sup>®</sup>) quando empregadas, foram diluídas em salina.

A gordura de origem animal foi representada pela gordura de porco Batavo<sup>®</sup> e a gordura de origem vegetal pelo óleo de soja Cocamar<sup>®</sup>. O tetracloreto de carbono (ISOFAR) empregado foi emulsificado em 40% de óleo de soja Cocamar<sup>®</sup>.

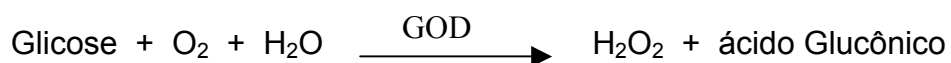
## 4. METODOLOGIA E RESULTADOS

### 4.1 Análises Bioquímicas

As concentrações de glicose, triacilglicerol, colesterol, AST e ALT foram determinadas utilizando-se kits da Labtest Diagnóstica (Labtest Diagnóstica S.A., Minas Gerais – Brasil).

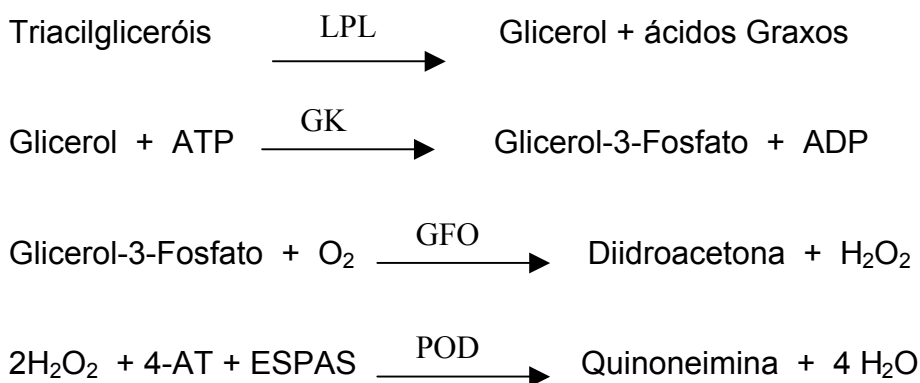
#### 4.1.1 Determinação da concentração sérica de glicose

O método enzimático para determinação da glicemia (BERGMEYER & BERNT, 1974) baseia-se em uma reação de oxidação da glicose. Esta reação envolve as enzimas glicose oxidase (GOD) e peroxidase (POD) e tem como produto final um composto colorido, a antipirilquinonimina (APQ), cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra, determinada fotometricamente em 505 nm e o resultado expresso em mg/dL.



#### 4.1.2 Determinação da concentração sérica de triacilglicerol

A concentração sérica de triacilglicerol foi determinada por método enzimático (BUCOLO & DAVID, 1973), no qual o triacilglicerol é hidrolizado pela ação da lipoproteína lipase (LPL), em glicerol e ácidos graxos. O glicerol, sob ação da glicerolquinase (GK) é convertido em glicerol-3-fosfato, que por sua vez é oxidado a diidroacetona e  $H_2O_2$ , na presença da glicerolfosfato oxidase (GFO). A peroxidase (POD) catalisa então uma reação de acoplamento entre  $H_2O_2$ , 4-aminoantipirina (4AT) e ESPAS, resultando em um composto de cor violeta, a quinoneimina, que é medida fotometricamente em 540 nm e o resultado expresso em mg/dL.

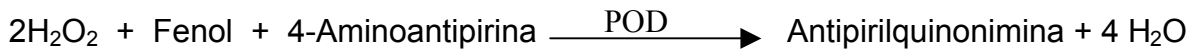
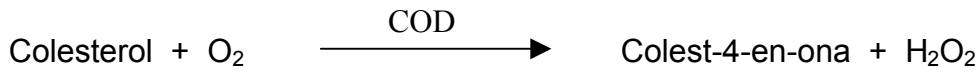


#### 4.1.3 Determinação da concentração sérica de colesterol total

Para determinação do colesterol total foi utilizado método enzimático (ALLAIN *et al.*, 1974), no qual ésteres de colesterol na presença de colesterol esterase (CET), colesterol oxidase (COD) e peroxidase (POD), dão origem a um derivado quinonímico de cor vermelha, cuja intensidade (medida fotometricamente



em 500 nm) é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra. Os valores obtidos foram expressos em mg/dL.



#### 4.1.4 Determinação da concentração sérica de aspartato amino transferase (AST)

A AST foi determinada por metodologia cinética (BERGMEYER *et al.*, 1978) baseada no princípio de que a AST catalisa especificamente a transferência do grupo amina do ácido aspártico para o cetoglutarato. Os produtos desta transferência são glutamato e oxalacetato. Este último é reduzido pela malato desidrogenase (MDH) a malato, enquanto a coenzima NADH é oxidada a NAD. Quando a NADH é oxidada há uma redução na absorbância em 340 nm, esta redução, monitorizada fotometricamente, é diretamente proporcional à atividade da AST na amostra, que foi expressa em U/L.



#### 4.1.5 Determinação da concentração sérica de alanina amino transferase (ALT)

O método para determinação da ALT é o mesmo definido para a AST. Entretanto esta enzima catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o cetoglutarato, resultando em glutamato e piruvato. Durante a redução do piruvato a lactato, pela lactato desidrogenase, acontece a oxidação da coenzima NADH e conseqüentemente uma queda na absorbância, a qual monitorizada fotometricamente (340 nm) representa a atividade da ALT na amostra. O resultado foi expresso em U/L.



#### 4.2 Análise Estatística

A significância estatística foi calculada usando teste-*t* de *Student* não pareado e o ANOVA não paramétrico com o teste de múltiplas comparações de *Newman-Keuls*. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do *Software GraphPad* versão 3.0. Sendo que  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **4.3 Modelos experimentais animais para estudos de PNBA com potencial antidiabético**

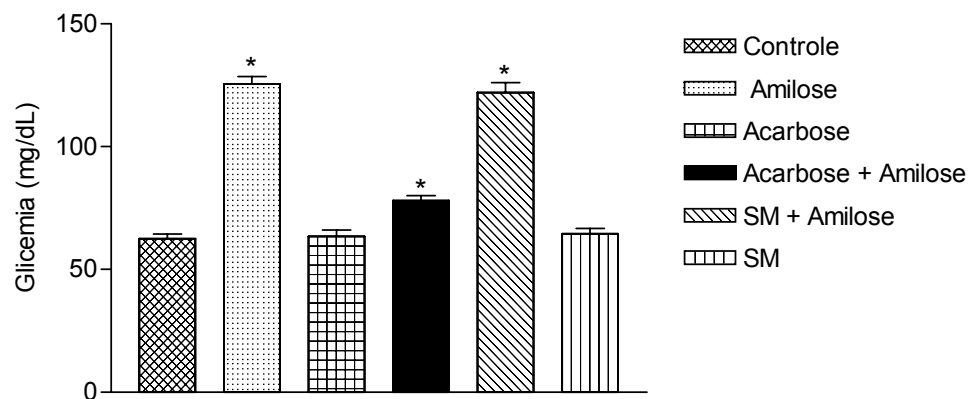
#### **4.3.1 Modelo experimental para investigação de PNBA com o potencial de inibir a degradação de polissacarídeos**

Os inibidores da  $\alpha$ -glicosidase (acarbose, miglitol, etc) tornam mais lenta a degradação de polissacarídeos em monossacarídeos. Assim neste modelo empregamos amido solúvel (amilose), como fonte de polissacarídeo e o inibidor de  $\alpha$ -glicosidase, acarbose, presente na especialidade farmacêutica Glucobay<sup>®</sup> (BAYER).

Os animais foram mantidos em jejum por 15 horas, para descartar uma possível interferência da presença de alimentos no trato gastrintestinal e então divididos em 4 grupos: 1. Grupo Controle: receberam água (0,1 mL/100g), via intragástrica (IG), visando detectar uma possível interferência da manipulação do animal sobre a glicemia; 2. Grupo Amilose: receberam amilose (1g/Kg), via IG, visando avaliar o impacto deste polissacarídeo na glicemia; 3. Grupo Acarbose: receberam acarbose (12 mg/Kg), via IG, para avaliar o efeito deste fármaco sobre a glicemia de jejum e 4. Grupo controle positivo (Acarbose + Amilose): receberam Acarbose (12mg/Kg) + Amilose (1g/Kg), via IG. Este grupo foi incluído no estudo com o objetivo de avaliar a interferência da acarbose na elevação da glicemia promovida pela amilose. Este modelo experimental foi utilizado para avaliar o potencial anti-hiperglicemiante da berinjela (SM-H). Para este experimento foram acrescentados mais dois grupos de ratos: o 5º Grupo (SM + Amilose) que recebeu SM-H (10mg/Kg) + amilose (1g/Kg), via IG e o 6º Grupo (SM) que recebeu SM-H (10mg/Kg), via IG.

A acarbose e a SM-H foram administradas 10 minutos antes da amilose. Decorridos 30 minutos da administração da amilose os animais foram decapitados e a partir do sangue obtido, avaliamos a concentração sérica de glicose.

Na **Figura 1** podemos observar que a administração de amilose elevou ( $P < 0,05$ ) a glicemia e o inibidor de  $\alpha$ -glicosidase (acarbose), apesar de, isoladamente, não alterar a glicemia, evitou sua elevação ( $P < 0,05$ ) no grupo de ratos que receberam amilose e acarbose. Os resultados ainda demonstram claramente que o PNBA testado, ou seja, o extrato seco de SM-H, isoladamente não altera a glicemia e também não interfere na elevação da glicemia promovida pela amilose.

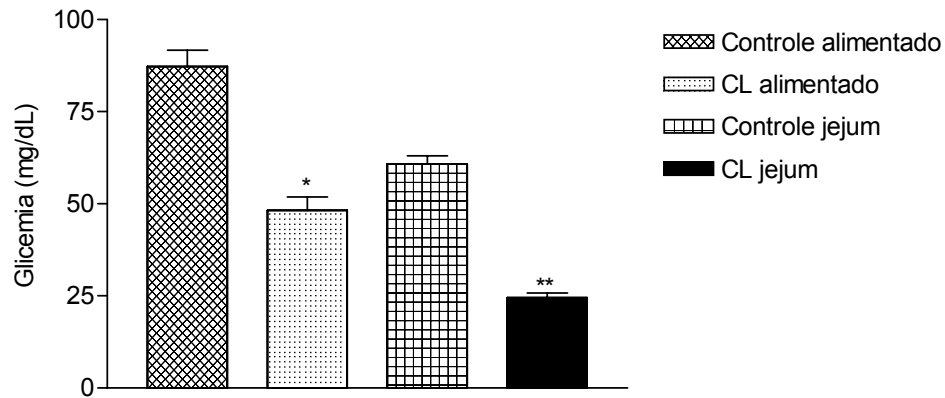


**Figura 1** - Efeito agudo da acarbose (AC) e *Solanum melongena* Herbarium® (SM-H) na elevação da glicemia promovida por amilose (AM) em ratos Wistar em jejum. Empregamos seis grupos de animais. 1) grupo controle (n=7): recebeu água; 2) grupo Amilose (n=7): recebeu amilose (1,0 g/kg); 3) grupo Acarbose (n=7): recebeu acarbose (12 mg/kg); 4) grupo Acarbose + Amilose (n=7): recebeu acarbose (12 mg/kg) + amilose (1,0 g/kg); 5) grupo SM + Amilose (n=7): recebeu SM-H (10 mg/kg) + amilose (1,0 g/kg) e 6) grupo SM (n=7): recebeu SM-H (10 mg/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intragástrica e a glicemia foi avaliada 30 min após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  (Análise de variância - *Newman-Keuls test*) quando comparado ao grupo controle.

#### **4.3.2 Modelo experimental para investigação de PNBAs com o potencial de estimular a secreção de insulina.**

A clorpropamida (CL) é um antidiabético oral do grupo das sulfoniluréias que atua, principalmente, estimulando a secreção de insulina pelas células pancreáticas. Para constituir este modelo utilizamos clorpropamida (100mg/kg), administrada por via intragástrica, em animais alimentados (Grupo CL alimentado) e em jejum de 22 horas (Grupo CL jejum). Adicionalmente dois grupos de ratos controles, alimentados e em jejum de 22 horas, que receberam água, pela mesma via e volume administrado aos grupos tratados, foram empregados. Após 30 minutos da administração de CL ou água, os animais foram decapitados e o sangue colhido para determinação da glicemia.

Na **Figura 2** encontram-se expressos os resultados deste experimento, onde podemos observar que a clorpropamida (CL) foi capaz de reduzir ( $P < 0,05$ ) a glicemia tanto em ratos alimentados como em jejum.



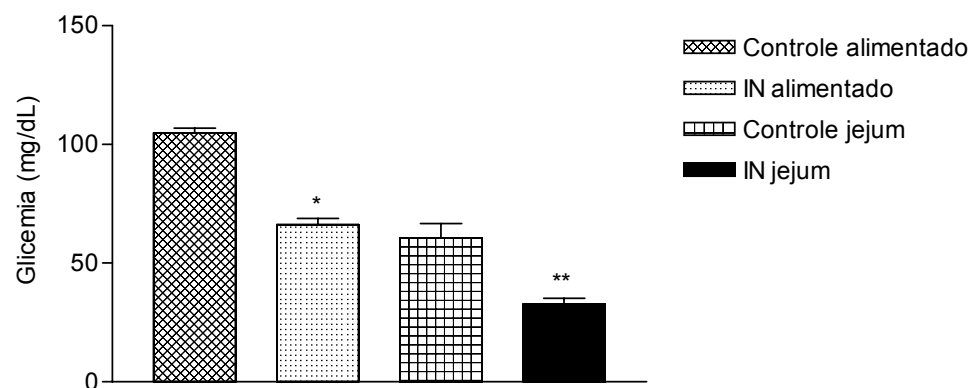
**Figura 2** – Efeito agudo da clorpropamida (CL) na glicemia de ratos alimentados ou em jejum. Empregamos quatro grupos de animais. 1) grupo controle alimentado (n=6): constituído de ratos alimentados que receberam água; 2) grupo CL alimentado (n=6): constituído de ratos alimentados que receberam CL (100 mg/kg); 3) grupo controle jejum (n=6): constituído de ratos em jejum que receberam água; 4) grupo CL jejum (n=6): constituído de ratos em jejum que receberam CL (100 mg/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intragástrica e a glicemia foi avaliada 30 min após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0,05 comparado ao grupo controle alimentado; \*\* P < 0,05 comparado com grupo controle jejum (teste t não pareado).

#### 4.3.3 Modelo experimental para investigação de PNBAs com o potencial de simular a ação da insulina sobre glicemia.

A insulina regular Biobras<sup>®</sup> de origem humana (IN) é um antidiabético parenteral que ao ser administrado em ratos não diabéticos, simula as ações da insulina endógena. Para constituir este modelo utilizamos uma dose de 1 U/Kg, administrada por via intraperitoneal. Na tentativa de avaliar a diferença da ação hipoglicemiante deste composto em animais alimentados e em jejum, dois grupos de ratos foram empregados: o grupo IN alimentado e o grupo IN jejum (animais em

jejum de 22 horas). Como controles também foram empregados dois grupos, alimentados e em jejum de 22 horas, que receberam salina, pela mesma via e volume administrado aos grupos tratados. Após 30 minutos da administração destas substâncias os animais foram decapitados e o sangue colhido para determinação da glicemia.

Na **Figura 3**, onde estão representados os resultados deste experimento, observamos que a insulina reduziu ( $P < 0,05$ ) a glicemia tanto em ratos Wistar alimentados quanto em jejum.



**Figura 3** – Efeito agudo da insulina regular (IN) na glicemia de ratos alimentados ou em jejum. Empregamos quatro grupos de animais. 1) grupo controle alimentado (n=6): constituído de ratos alimentados que receberam salina; 2) grupo IN alimentado (n=5): constituído de ratos alimentados que receberam IN (1 U/kg); 3) grupo controle jejum (n=5): constituído de ratos em jejum que receberam salina; 4) grupo IN jejum (n=6): constituído de ratos em jejum que receberam IN (1 U/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intraperitoneal e a glicemia foi avaliada 30 min após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  comparado com grupo controle alimentado; \*\*  $P < 0,05$  comparado com grupo controle jejum (Teste *t* não pareado).

#### **4.3.4 Modelo experimental para investigação de PNBA's com influência no teste oral e intraperitoneal de tolerância à glicose.**

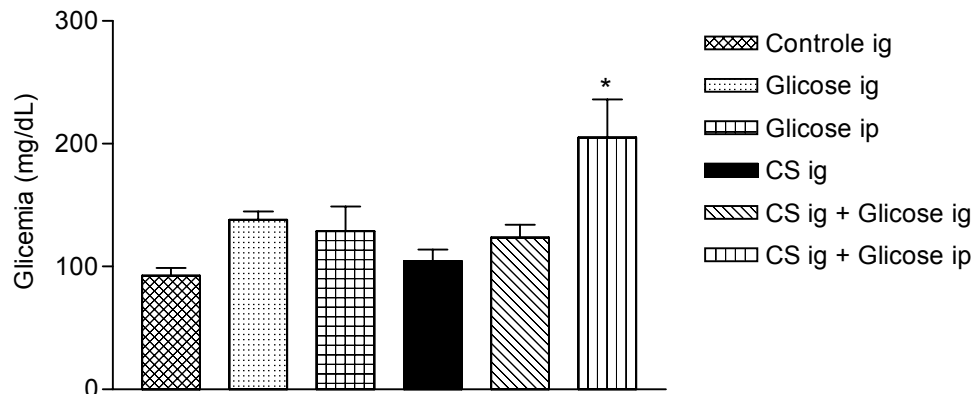
Neste modelo foram empregados ratos em jejum de 22 horas, divididos em 6 grupos, que receberam: 1. salina via intragástrica (Grupo controle ig); 2. solução de glicose 50% na dose de 1 g/kg via intragástrica (Grupo glicose ig); 3. solução de glicose 50% na dose de 1 g/kg via intraperitoneal (Grupo glicose ip); 4. Extrato aquoso de *Cissus sicyoides* (CS) 1 g/kg via intragástrica (Grupo CS ig); 5. Extrato aquoso de CS 1 g/kg via intragástrica + solução de glicose 50% na dose de 1 g/kg via intragástrica (Grupo CS ig + Glicose ig); 6. Extrato aquoso de CS 1 g/kg via intragástrica + solução de glicose 50% na dose de 1 g/kg via intraperitoneal (CS ig + Glicose ip). Em seguida, ou seja, 30 minutos após a administração destas substâncias os animais foram decapitados e o sangue colhido para a dosagem de glicose sérica. Como o número de animais a serem sacrificados era muito grande em relação ao tempo disponível para a decapitação, fez se necessário um planejamento do horário da administração das substâncias e do sacrifício dos animais, cujos detalhes são apresentados na **Tabela A**.



**Tabela A** - Cronograma de administração de salina, extrato aquoso de CS e glicose em animais, submetidos ao teste oral e intraperitoneal (I.P.) de tolerância à glicose.

RATO N°	HORÁRIO DE ADMINISTRAÇÃO	HORÁRIO DE SACRIFÍCIO
1	10:00 = Salina Via Oral	10:30
2	10:01 = Extrato Via Oral	10:31
3	10:02 = Glicose Oral	10:32
4	10:03 = Extrato Oral + Glicose Oral	10:33
5	10:04 = Extrato Oral + Glicose I.P.	10:34
6	10:05 = Glicose I.P. + Salina Oral	10:35
7	10:06 = Salina Via Oral	10:36
8	10:07 = Extrato Via Oral	10:37
9	10:08 = Glicose Oral	10:38
10	10:09 = Extrato Oral + Glicose Oral	10:39
11	10:10 = Extrato Oral + Glicose I.P.	10:40
12	10:11 = Glicose I.P. + Salina Oral	10:41
13	10:12 = Salina Via Oral	10:42
14	10:13 = Extrato Via Oral	10:43
15	10:14 = Glicose Oral	10:44
16	10:15 = Extrato Oral + Glicose Oral	10:45
17	10:16 = Extrato Oral + Glicose I.P.	10:46
18	10:17 = Glicose I.P. + Salina Oral	10:47
19	10:18 = Salina Via Oral	10:48
20	10:19 = Extrato Via Oral	10:49
21	10:20 = Glicose Oral	10:50
22	10:21 = Extrato Oral + Glicose Oral	10:51
23	10:22 = Extrato Oral + Glicose I.P.	10:52
24	10:23 = Glicose I.P. + Salina Oral	10:53
25	10:24 = Salina Via Oral	10:54
26	10:25 = Extrato Via Oral	10:55
27	10:26 = Glicose Oral	10:56
28	10:27 = Extrato Oral + Glicose Oral	10:57
29	10:28 = Extrato Oral + Glicose I.P.	10:58
30	10:29 = Glicose I.P. + Salina Oral	10:59

Observamos (**Figura 4**) neste experimento que, apesar de não obtermos uma diferença significativa na elevação da glicemia nos animais que receberam glicose (grupos ig e ip), o extrato aquoso de CS não alterou a tolerância à glicose administrada via intragástrica e diminuiu ( $P < 0,05$ ) a tolerância à glicose administrada via intraperitoneal.



**Figura 4** – Tolerância à solução de glicose 50% na dose de 1 g/kg (GLIC) administrada pela via intragástrica (ig) ou intraperitoneal (ip) na presença ou ausência de *Cissus sicyoides* (CS) administrado via ig. Empregamos 6 grupos de ratos (n=5) em jejum que receberam: 1. salina via ig (Grupo controle ig); 2. GLIC via ig (Grupo glicose ig); 3. GLIC via ip (Grupo glicose ip); 4. Extrato liofilizado de CS 1 g/kg via ig (Grupo CS ig); 5. CS ig + Glicose ig; 6. CS ig + Glicose ip. Em seguida, ou seja, 30 min. após a administração destas substâncias coletamos sangue para avaliação da glicemia. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0,05 quando comparado ao grupo Glicose ip (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

#### 4.3.5 Modelo experimental para investigação de PNBAs com potencial antidiabético empregando ratos com Diabetes Mellitus (DM) induzido por aloxana.

O uso de compostos químicos, como a aloxana, para induzir animais ao diabetes é amplamente empregado. Neste modelo empregamos ratos em jejum de 15 horas, que receberam aloxana (40mg/Kg), via endovenosa (veia peniana). Após 5 dias da administração de aloxana foram coletadas amostras de sangue dos animais alimentados, através do corte da ponta da cauda, para avaliação da glicemia. Animais com níveis de glicose sanguínea igual ou superior a 240 mg/dL foram considerados diabéticos. Porém em função da heterogeneidade da glicemia (**Tabela B**) fez-se necessário o pareamento dos animais antes do tratamento (**Tabela C**).

**Tabela B** - Glicemia de ratos alimentados, 5 dias após administração de aloxana.

Rato	Glicemia (mg/dL)
1	642,6
2	342,1
3	279,9
4	445,6
5	419,9
6	M
7	241,0
8	525,2
9	M
10	398,9
11	362,1
12	M
13	M
14	343,0
15	M
16	M
17	269,0
18	352,4
19	435,6
20	M
21	251,5

M = morte

**Tabela C** – Distribuição pareada dos ratos (alimentados) por grupo a ser tratado, de acordo com os valores da glicemia, após 5 dias da administração de aloxana.

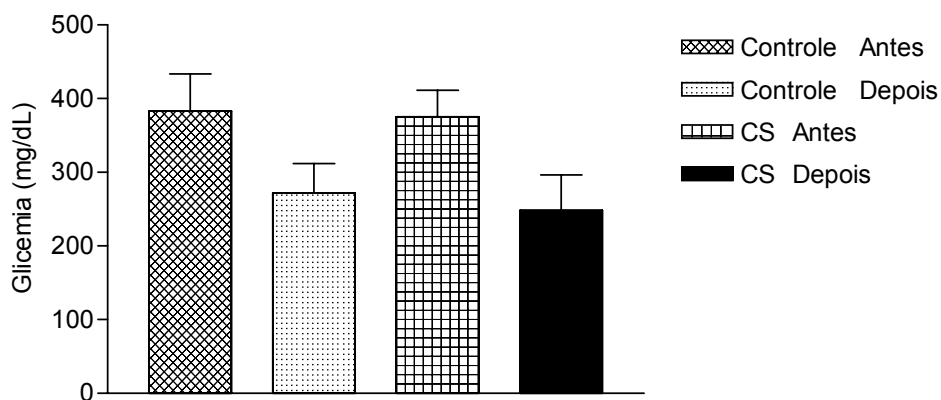
Ratos	Glicemia (mg/dL)	Ratos	Glicemia (mg/dL)
01	642,6	08	525,2
19	435,6	04	445,6
10	398,9	05	419,9
18	352,4	11	362,1
02	342,1	14	343,0
17	269,0	03	279,9
07	241,0	21	251,5
<b>n</b>	<b>7</b>		<b>7</b>
<b>M</b>	<b>383,1</b>		<b>375,3</b>
<b>DP</b>	<b>133,00</b>		<b>95,78</b>

n= número de ratos tratados por grupo; M = média; DP = desvio padrão.

Após o pareamento em dois grupos, empregamos este modelo para testar o potencial antidiabético do extrato aquoso de *Cissus sicyoides* (CS). O grupo controle recebeu DMSO, em volume equivalente ao usado para diluir o CS. Os animais tratados com extrato de CS (50mg/Kg duas vezes ao dia) foram definidos como grupo **CS**. Os tratamentos foram realizados por via intraperitoneal (I.P.), durante 5 dias.

Após o tratamento os ratos, não submetidos ao jejum, foram decapitados e o sangue colhido para avaliação da glicemia.

Os resultados deste tratamento estão expostos na **Figura 5** e mostram uma pequena redução ( $P > 0,05$ ) da glicemia no grupo tratado com CS, quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, ao se observar os valores da glicemia do grupo controle e do grupo CS, antes e após o tratamento, percebemos que houve reversão parcial do quadro diabético, já que em ambos os grupos (controle e CS) a glicemia diminuiu.



**Figura 5** – Efeito do tratamento com extrato de *Cissus sicyoides*, grupo **CS** (n=7), dissolvido em DMSO ou do tratamento com DMSO, grupo controle (n=7), administrados pela via intraperitoneal, sobre a glicemia de ratos Wistar alimentados portadores de DM induzido por aloxana. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão.

#### **4.4 Modelos experimentais para estudos de PNBAs com potencial hipolipemiante**

##### **4.4.1 Modelo experimental para investigação de PNBAs com o potencial de alterar a absorção de gordura de origem animal**

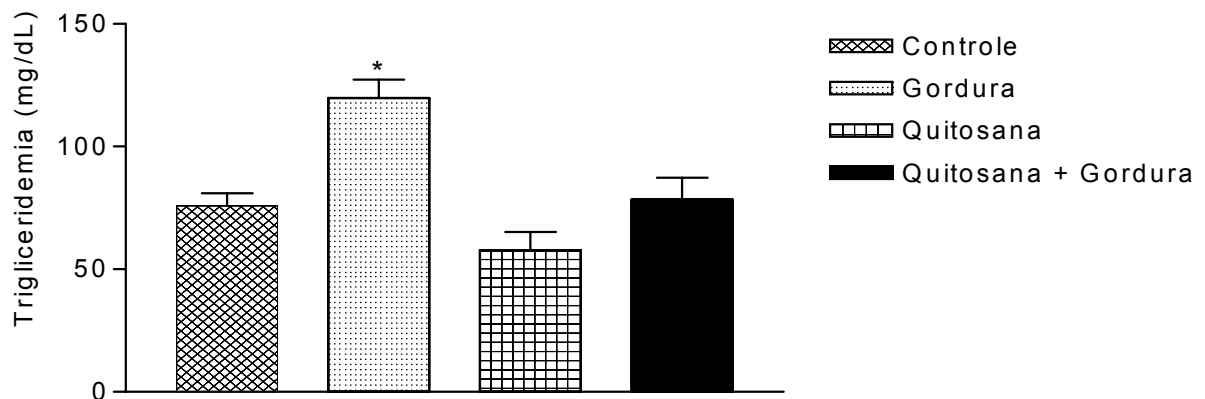
A quitosana, um composto natural obtido principalmente de conchas de crustáceos, está presente na formulação do Reducal<sup>®</sup> associada ao ácido ascórbico. Este fármaco tem sido prescrito para o controle de peso corpóreo por diminuir a absorção de gordura da dieta.

Este modelo foi constituído para avaliação do efeito da administração aguda, via intragástrica, de 2,0 mL/Kg de Gordura Batavo<sup>®</sup> (GB), associada ou não ao Reducal<sup>®</sup> (500mg/Kg), sobre as concentrações séricas de triacilglicerol.

Os animais, em jejum de 22 horas, foram divididos em 4 grupos: grupo Controle, constituído por ratos que receberam água; grupo Gordura, constituído de ratos que receberam GB; grupo Quitosana com ratos que receberam Reducal<sup>®</sup> e o grupo Quitosana + Gordura, constituído de ratos que receberam Reducal<sup>®</sup> + GB. Todas as substâncias foram administradas via intragástrica, sendo que no último grupo descrito, o Reducal<sup>®</sup> foi administrado 10 minutos antes da GB. Após 30 minutos da última administração os ratos foram decapitados e o sangue colhido para a dosagem sérica de triacilglicerol.

Os resultados obtidos empregando este modelo (**Figura 6**), mostram que a gordura de porco Batavo<sup>®</sup> elevou ( $P < 0,05$ ) a trigliceridemia nos ratos Wistar em jejum e o Reducal<sup>®</sup>, quando administrado isoladamente, não alterou a

concentração sérica de triacilglicerol, mas impediu ( $P < 0,05$ ) a elevação da trigliceridemia promovida pela gordura de porco Batavo<sup>®</sup>.



**Figura 6** - Efeito agudo da Quitosana (Reducal<sup>®</sup>) na elevação da concentração sérica de triacilglicerol promovida por gordura de origem animal (Gordura Batavo<sup>®</sup>) em ratos Wistar em jejum. Empregamos quatro grupos de animais. 1) grupo Controle (n=7): recebeu água; 2) grupo Gordura (n=8): recebeu gordura Batavo<sup>®</sup> (2 mL/kg); 3) grupo Quitosana (n=8): recebeu Reducal<sup>®</sup> (500 mg/kg); 4) grupo Quitosana + Gordura (n=8): recebeu Reducal<sup>®</sup> (500 mg/kg) + gordura Batavo<sup>®</sup> (2 mL/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intragástrica e a concentração sérica de triacilglicerol foi avaliada 30 min. após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \*  $P < 0,05$  quando comparado ao grupo Controle (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

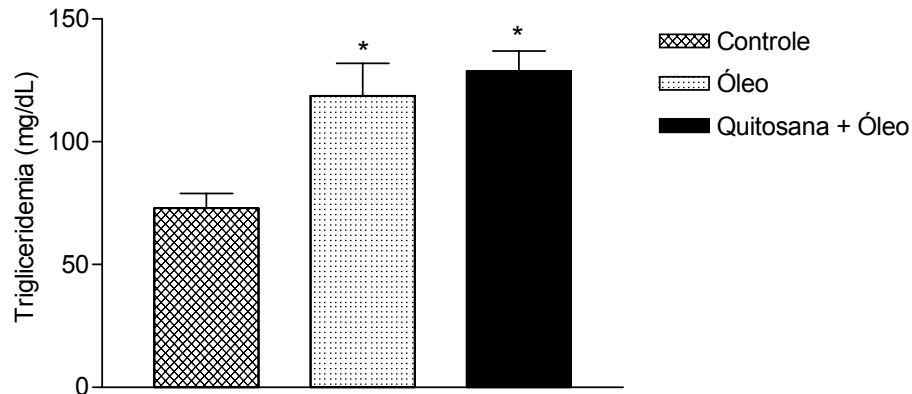
#### 4.4.2 Modelo experimental para investigação de PNBAs com o potencial de alterar a absorção de gordura de origem vegetal

##### 4.4.2.1 Empregando Quitosana (Reduçal<sup>®</sup>)

Este modelo diferencia-se do descrito anteriormente, basicamente pelo fato de empregarmos gordura de origem vegetal (óleo de soja Cocamar<sup>®</sup> ou OSC), em substituição à gordura de origem animal.

Para constituir este modelo animais em jejum (22 horas) foram divididos em 3 grupos: grupo Controle, que recebeu água; grupo Óleo, que recebeu OSC (7,5 mL/Kg) e grupo Quitosana + Óleo que recebeu Reduçal<sup>®</sup> (500 mg/Kg) + OSC (7,5 mL/Kg). Todas as substâncias foram administradas via intragástrica, sendo que no último grupo descrito o Reduçal<sup>®</sup> foi administrado 10 minutos antes do OSC. Após 60 minutos da última administração os ratos foram decapitados e o sangue colhido, sem anticoagulante, para a avaliação da trigliceridemia.

Na **Figura 7** estão representados os resultados obtidos neste experimento onde podemos observar que o OSC foi capaz de elevar ( $P < 0,05$ ) a trigliceridemia de ratos Wistar em jejum, entretanto o Reduçal<sup>®</sup> não impediu a elevação da trigliceridemia promovida pelo OSC.



**Figura 7-** Efeito agudo da Quitosana (Reduical<sup>®</sup>) na elevação da concentração sérica de triacilglicerol promovida por gordura de origem vegetal (óleo de soja Cocamar<sup>®</sup> ou OSC) em ratos Wistar em jejum. Empregamos três grupos de animais. 1) grupo controle (n=4): recebeu água; 2) grupo Óleo (n=6): recebeu OSC (7,5 mL/kg); 3) grupo Quitosana + Óleo (n=5): recebeu Reduical<sup>®</sup> (500 mg/kg) + OSC (7,5 mL/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intragástrica e a concentração sérica de triacilglicerol foi avaliada 60 min após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0,05 quando comparado ao grupo Controle (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

#### 4.4.2.2 Empregando Orlistat (Xenical<sup>®</sup>)

O orlistat é um fármaco utilizado no controle de peso por diminuir a absorção de gorduras da dieta.

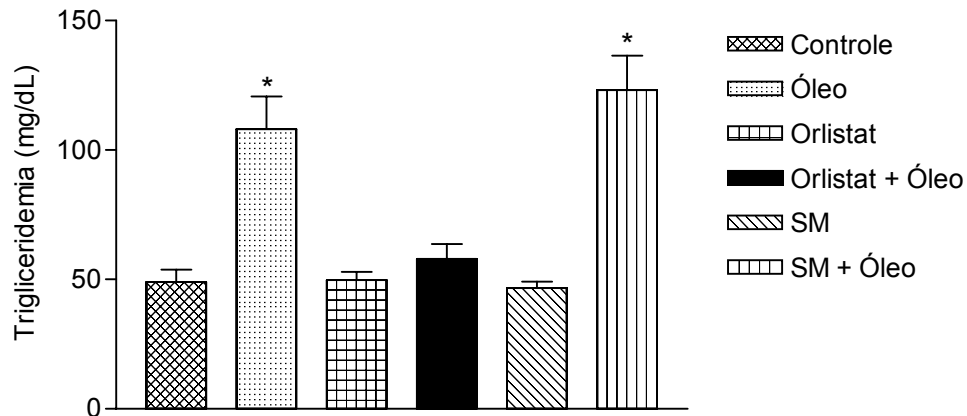
Neste modelo avaliamos a trigliceridemia após a administração de gordura vegetal (OSC), usando orlistat (Xenical<sup>®</sup>) + OSC como controle positivo.

Ratos em jejum de 15 horas foram divididos em 6 grupos: 1. grupo Controle que recebeu água; 2. grupo Óleo recebeu OSC (6,0 mL/Kg); 3. grupo Orlistat recebeu Xenical<sup>®</sup> (10 mg/Kg); 4. grupo Orlistat + Óleo recebeu Xenical<sup>®</sup> (10 mg/Kg) + OSC (6,0 mL/Kg). Aplicando este modelo, avaliamos o efeito da berinjela (SM-H) sobre a trigliceridemia, com ou sem a administração do OSC. Para



tal, adicionamos os grupos: 5. grupo SM, que recebeu SM-H (10 mg/Kg) e 6. grupo SM + Óleo, que recebeu SM-H (10 mg.Kg) + OSC (6,0 mL/Kg). Os ratos receberam as substâncias testadas ou água e 10 minutos depois receberam o óleo ou água. De tal modo que, neste modelo e em todos os outros onde os animais receberam duas substâncias, cada rato foi manipulado duas vezes, recebendo duas gavagens (administrações intragástricas). O sangue foi colhido por decapitação 60 minutos após a última administração para avaliação da trigliceridemia. Devido ao grande número de ratos a serem manipulados neste modelo, também aplicamos um cronograma de administração de drogas ou água, semelhante ao realizado no modelo de TTG (item 4.3.4), apresentado na tabela A.

Os resultados obtidos neste experimento, representados na **Figura 8**, nos mostram uma elevação ( $P < 0,05$ ) na trigliceridemia no grupo que recebeu OSC e nenhuma alteração na trigliceridemia no grupo que recebeu orlistat (Xenical<sup>®</sup>). Entretanto este composto foi capaz de impedir a elevação ( $P < 0,05$ ) da trigliceridemia promovida pelo OSC. Já a SM-H testada neste modelo não teve qualquer ação sobre a trigliceridemia, quando administrada isoladamente e não impediu a elevação da concentração de triacilglicerol promovida pelo OSC.



**Figura 8** - Efeito Agudo do extrato seco de *Solanum melongena* Herbarium® (SM-H) e Orlistat (Xenical®), na elevação da concentração sérica de triacilglicerol promovida por gordura de origem vegetal (óleo de soja Cocamar® ou OSC) em ratos Wistar em jejum. Empregamos seis grupos de animais. 1) grupo Controle (n=9): recebeu água; 2) grupo Óleo (n=9): recebeu OSC (6,0 mL/kg); 3) grupo Orlistat (n=9): recebeu Xenical® (10mg/Kg); 4) Grupo Orlistat + Óleo (n=8): recebeu Xenical® (10 mg/kg) + OSC (6,0 mL/kg); 5) Grupo SM (n=9): recebeu SM-H (10mg.Kg) e 6) Grupo SM + Óleo (n=9): recebeu SM-H (10 mg/Kg) + OSC (6,0 mL/kg). Todos os grupos receberam as substâncias pela via intragástrica e a concentração sérica de triacilglicerol foi avaliada 60 min após a administração das mesmas. Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão. \* P < 0,05 em comparação com o grupo Controle (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

#### 4.4.3 Modelo experimental para investigação de PNBA com potencial hipolipemiante empregando ratos com Diabetes Mellitus (DM) induzido por aloxana.

Um grupo de ratos, em jejum de 15 horas, recebeu Aloxana (40mg/Kg), via endovenosa (veia peniana). Após 5 dias foram coletadas amostras de sangue dos animais alimentados, através do corte da ponta da cauda, para avaliação da glicemia.

Todos os ratos com glicemia > 250mg/dL foram considerados diabéticos e mantidos no biotério, com água e ração *ad libitum*, até o início do tratamento com o PNBA.

Após 30 dias da administração de aloxana, os ratos (não submetidos ao jejum) tiveram sua glicemia novamente avaliada, em sangue colhido da cauda. Após 24 horas desta coleta, os ratos (em jejum de 15 horas) foram avaliados quanto a trigliceridemia e glicemia (sangue colhido da cauda).

Os ratos diabéticos com trigliceridemia acima de 80mg/dL foram selecionados, divididos em 2 grupos homogêneos (de acordo com a trigliceridemia) e utilizados como modelo para avaliação do potencial hipolipemiante da berinjela (SM-H). Sendo que o grupo controle recebeu água e o grupo SM recebeu SM-H (10mg/Kg/dia), via intragástrica, durante 15 dias.

No último dia de tratamento, os ratos, em estado alimentado, tiveram seu sangue colhido da cauda, para avaliação do diabetes através da glicemia. No dia seguinte, após jejum de 15 horas, o sangue foi colhido por decapitação para avaliação da glicemia e trigliceridemia.

Os resultados da glicemia dos animais, antes de serem submetidos ao jejum, estão representados na **Tabela 1**, onde observamos uma redução ( $P < 0,05$ ) da glicemia no grupo tratado. Entretanto esta redução ( $P < 0,05$ ) também é observada no grupo controle.

**Tabela 1** – Glicemia de ratos Wistar **alimentados**, portadores de diabetes mellitus induzido por aloxana, antes e depois do tratamento com SM-H (grupo SM) ou água (grupo controle).

Glicemia (mg/dL)				
	Controle Antes	Controle Depois	SM Antes	SM Depois
	366,2	324,8	514,9	343,2
	465,7	341,1	473,4	340,4
	456,8	334,7	509,2	-
	461,4	331,9	497,1	339,7
	364,2	151,7	498,9	342,5
	525,4	339,7	522,3	340,4
	462,0	339,7	313,3	251,0
<b>N =</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>M =</b>	<b>443,1</b>	<b>309,1*</b>	<b>475,6</b>	<b>326,2**</b>
<b>DP</b>	<b>58,17</b>	<b>69,63</b>	<b>73,26</b>	<b>36,87</b>

n= número de ratos tratados por grupo; M = média; DP = desvio padrão. \* P < 0,05 quando comparado com o grupo Controle Antes e \*\* P < 0,05 quando comparado com o grupo SM Antes (Teste t não pareado).

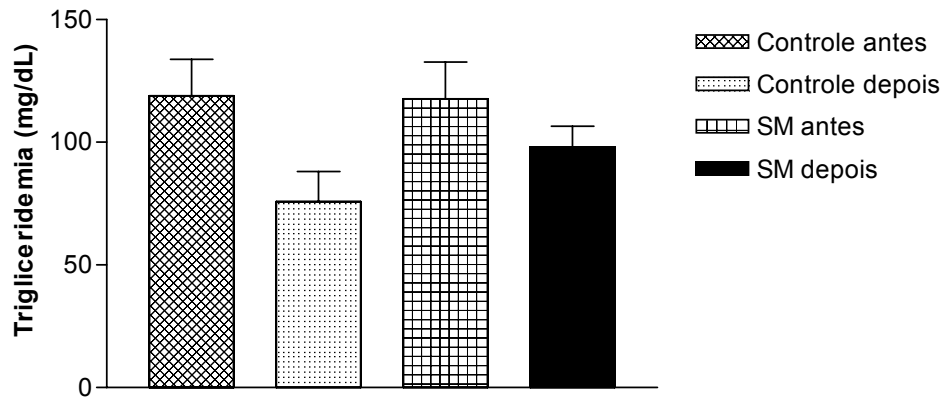
O resultado da glicemia destes animais diabéticos após o período de jejum está representado na **Tabela 2**, onde observamos uma intensa redução dos valores da glicemia quando comparados com seus respectivos resultados antes do período de jejum.

**Tabela 2** - Glicemia de ratos Wistar **em jejum** de 15 horas, portadores de diabetes mellitus induzido por aloxana, antes e depois do tratamento com SM-H (grupo **SM**) ou água (grupo controle).

<b>Glicemia (mg/dL)</b>				
	<b>Controle Antes</b>	<b>Controle Depois</b>	<b>SM Antes</b>	<b>SM Depois</b>
	76.0	83.8	169.6	216.2
	82.5	98.6	92.1	97.6
	90.3	100.8	345.4	-
	66.6	84.7	126.6	112.5
	76.6	84.2	107.5	126.0
	115.5	201.0	166.3	109.2
	98.9	106.0	102.4	96.7
<b>N =</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
<b>M =</b>	<b>86,6</b>	<b>108,4</b>	<b>158,6</b>	<b>126,4</b>
<b>DP</b>	<b>16,48</b>	<b>41,81</b>	<b>87,84</b>	<b>45,31</b>

n= número de ratos tratados por grupo; M = média e DP = desvio padrão.

Na **Figura 9** estão apresentados os valores da trigliceridemia, antes e após o tratamento com SM-H. Podemos observar que o tratamento dos ratos diabéticos com SM-H resultou em redução não significativa na concentração sérica de triacilglicerol, em relação ao grupo SM antes do tratamento. Entretanto uma redução, um pouco maior que no grupo SM, mas também não significativa, ocorre com o grupo controle.



**Figura 9** - Trigliceridemia de ratos Wistar em jejum de 15 horas, portadores de diabetes mellitus induzido por aloxana, antes e depois do tratamento com SM-H (grupo SM) ou água (grupo controle). Cada barra representa média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.4.4. Modelo experimental para investigação de PNBA's com potencial hipolipemiante empregando ratos normais.

##### 4.4.4.1 Usando Sinvastatina e Ciprofibrato como controles positivos.

A sinvastatina, um fármaco do grupo das estatinas, é empregada como agente hipocolesterolemizante enquanto o ciprofibrato, um derivado do ácido fíbrico, tem seu uso indicado, principalmente, para o tratamento da hipertrigliceridemia.

Neste modelo avaliamos o efeito da administração crônica de SM-H, via intragástrica, usando como controles positivos sinvastatina e ciprofibrato.

Os ratos foram divididos em 4 grupos, que receberam, por 15 dias, via intragástrica, 1 – Grupo Controle: água; 2 – Grupo Sinvastatina: 10 mg/Kg de sinvastatina; 3 - Grupo Ciprofibrato: 10 mg/Kg de ciprofibrato e 4 - Grupo SM: 10

mg/Kg de SM-H. No final do período de tratamento os ratos foram submetidos a um jejum de 15 horas e do sangue, colhido por decapitação, foram avaliadas a trigliceridemia e colesterolemia.

Os resultados deste experimento, representados na **Tabela 3**, mostram uma redução ( $P < 0.05$ ) da colesterolemia, sem alteração da trigliceridemia, no grupo de animais tratados com ciprofibrato e uma elevação ( $P > 0,05$ ) da colesterolemia sem alteração na trigliceridemia, no grupo tratado com sinvastatina por 15 dias. Nesta tabela observamos também que o grupo tratado com SM-H não apresentou nenhuma alteração na trigliceridemia e colesterolemia após os 15 dias de tratamento.

**Tabela 3** – Trigliceridemia e colesterolemia de ratos Wistar, em jejum de 15 horas, tratados, via intragástrica, durante 15 dias com Sinvastatina, Ciprofibrato e SM-H. Os 4 grupos de animais receberam: grupo Controle, água; grupo Sinvastatina, 10 mg/Kg de sinvastatina; grupo Ciprofibrato, 10mg/Kg de ciprofibrato e grupo SM, 10 mg/Kg de SM-H.

	<b>Controle (n=7)</b>	<b>Sinvastatina (n=7)</b>	<b>Ciprofibrato (n=7)</b>	<b>SM (n=7)</b>
<b>Triacilglicerol (mg/dL)</b>	<b>72,2 ± 12,47</b>	<b>74,5 ± 13,44</b>	<b>79,7 ± 9,75</b>	<b>68,7 ± 18,31</b>
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>70,2 ± 14,23</b>	<b>81,9 ± 5,40</b>	<b>52,2 ± 10,11*</b>	<b>75,0 ± 12,23</b>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo n = número de ratos tratados por grupo.  
\*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo Controle (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

#### 4.4.4.2 Usando Sinvastatina em dose elevada como controle positivo.

Neste modelo avaliamos o efeito da administração de doses elevadas (100mg/Kg) de SM-H e sinvastatina sobre a trigliceridemia e colesterolemia.

Os ratos foram divididos em 3 grupos, que receberam os seguintes tratamentos: grupo controle, água; grupo sinvastatina, 100mg/Kg de sinvastatina e grupo SM, 100mg/Kg de SM-H. Os tratamentos foram via intragástrica, por um período de 15 dias, após o qual, os ratos foram mantidos em jejum por 15 horas e do sangue, colhido por decapitação, foram avaliadas a trigliceridemia e colesterolemia.

Com os resultados representados na **Tabela 4**, podemos observar que o tratamento com 100 mg/Kg/dia de sinvastatina, elevou ( $P > 0,05$ ) a colesterolemia e diminuiu ( $P > 0,05$ ) a trigliceridemia dos ratos Wistar, após 15 dias. Entretanto observamos também que a dose de 100 mg/Kg/dia de SM-H não alterou a trigliceridemia e colesterolemia dos animais após 15 dias de tratamento.

**Tabela 4** – Trigliceridemia e colesterolemia de ratos Wistar em jejum de 15 horas, tratados, via intragástrica, durante 15 dias com doses elevadas de SM-H e Sinvastatina. Os 3 grupos de animais receberam: grupo controle, água; grupo sinvastatina, 100 mg/Kg de Sinvastatina e grupo SM, 100 mg/Kg de SM-H.

	<b>Controle n = 7</b>	<b>Sinvastatina n = 8</b>	<b>SM n = 8</b>
<b>Triacilglicerol (mg/dL)</b>	<b>85,1 ± 20,74</b>	<b>62,6 ± 9,77</b>	<b>78,1 ± 22,00</b>
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	<b>76,0 ± 11,33</b>	<b>88,9 ± 7,45</b>	<b>78,2 ± 12,55</b>

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo n = número de ratos tratados por grupo.



## **4.5 Modelo Experimental para Estudo de Toxicidade Aguda de PNBA.**

### **4.5.1 Modelo de experimento para avaliar a toxicidade aguda da SM-H, usando como padrão de toxicidade hepática o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>).**

Animais alimentados, divididos em 3 grupos, foram submetidos aos seguintes tratamentos: Grupo Controle, água; Grupo SM, SM-H na dose de 5g/Kg e Grupo CCl<sub>4</sub>, CCl<sub>4</sub> na dose de 2,5 mL/Kg . O valor de 5g/Kg de SM-H representa a maior dose possível de ser administrada, respeitada a capacidade de diluição da SM-H e volume máximo permitido para a via intragástrica. Os 3 grupos de animais foram subdivididos e metade do número de animais de cada grupo foi avaliado em 4 horas e a outra em 24 horas após as administrações. Foram avaliadas as concentrações séricas de AST e ALT do sangue colhido por decapitação.

Na **Tabela 5**, onde estão representados os resultados deste experimento, podemos observar que o CCl<sub>4</sub> aumentou as concentrações séricas de AST e ALT após as quatro primeiras horas ( $P > 0,05$ ) e após 24 horas ( $P < 0,05$ ) da administração. Entretanto, a alta dose de SM-H administrada, não alterou as concentrações de AST e ALT no soro dos animais testados, em 4 ou 24 horas após sua administração.

**Tabela 5** – Efeito da administração, via intragástrica, de SM-H (5g/Kg), grupo SM e CCl<sub>4</sub> (2,5mL/Kg), grupo CCl<sub>4</sub>, sobre a concentração sérica de AST e ALT em ratos Wistar, após 4 e 24 horas do tratamento. Grupo controle (água).

	Controle		SM		CCl <sub>4</sub>	
	4 horas n = 8	24 horas n = 8	4 horas n = 8	24 horas n = 9	4 horas n = 8	24 horas n = 8
<b>AST (U/L)</b>	153,0 ± 23,65	176,8 ± 48,08	194,2 ± 41,52	198,8 ± 61,76	255,8 ± 75,91	12400,00 ± 7577,00 *
<b>ALT (U/L)</b>	60,8 ± 9,04	71,3 ± 10,45	73,3 ± 6,46	68,81 ± 4,95	227,6 ± 108,20	7251,00 ± 3525,00*

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão, sendo n = número de ratos tratados por grupo.  
\* P < 0,05 quando comparado com o grupo controle 24 hs (Análise de variância - *Newman-Keuls test*).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Modelos experimentais animais para estudos de PNBA com potencial antidiabético

A complexidade do DM vem dificultando o tratamento eficaz desta doença. Entretanto os pesquisadores nunca desistiram de procurar por novos e mais eficazes fármacos antidiabéticos, sendo este o motivo de inúmeros trabalhos científicos. Diversos autores como MATHÉ (1995); CARNAUD, (1995); BUSCHARD, (1996); CHATTOPADHYAY *et al.* (1997); WONG & JANEWAY (1999) entre outros, têm ressaltado o valor dos modelos animais na pesquisa por novos fármacos para o tratamento do DM. Além disso, pesquisadores como SOBEL *et al.* (1998); POSPISILIK *et al.* (2002) e SANCHEZ *et al.* (2002), têm utilizado animais nestas pesquisas, inclusive empregando PNBA (SARKAR *et al.*, 1996; RAO *et al.*, 2001; CHAKRABARTI *et al.*, 2002(b); CARNEY *et al.*, 2002 entre outros).

Na procura por novos fármacos além de se conhecer a substância responsável pelo efeito desejado, é importante definir o mecanismo de ação deste novo agente. O uso de substâncias ou fármacos padrões, cuja ação é totalmente ou parcialmente conhecida, em um determinado modelo experimental, auxilia a descoberta do mecanismo de ação do provável fármaco.

Neste estudo avaliamos modelos, empregando ratos Wistar, na procura por novos PNBA com ação antidiabética, em experimentos agudos e crônicos. Em alguns destes modelos investigamos o potencial antidiabético de duas plantas: *Cissus sicyoides* (CS) e *Solanum melongena* (SM). O CS é empregado popularmente, no Brasil, para o tratamento do DM e a SM, apesar de popularmente

empregada para o tratamento de dislipidemia, existe relato de um possível efeito hipoglicêmico em ratos diabéticos (DERIVI *et al.*, 2002).

A Acarbose (Glucobay<sup>®</sup>-BAYER), é um oligossacarídeo, inibidor da  $\alpha$ -glicosidase. Atua inibindo competitivamente e reversivelmente as enzimas  $\alpha$ -glicosidases ligadas à membrana intestinal, resultando em retardo na absorção da glicose e redução da hiperglicemia pós-prandial (PICKUP & GARETH, 1991).

A resposta do rato Wistar frente ao inibidor de  $\alpha$ -glicosidase, acarbose, observada na **Figura 1**, é semelhante à observada em humanos (CHIASSON *et al.*, 2002). Como este modelo experimental, empregando acarbose, amilose e ratos Wistar, é facilmente reproduzível, torna-se muito interessante para a pesquisa de novos agentes com potencial anti-hiperglicemiante, com efeito farmacológico semelhante a acarbose. Entretanto, a SM-H não apresentou atividade anti-hiperglicemiante, provavelmente por não agir como um inibidor de  $\alpha$ -glicosidases.

As sulfoniluréias são fármacos empregados no tratamento de pacientes diabéticos desde a década de 50. A clorpropamida, um dos representantes da classe das sulfoniluréias, atua estimulando a secreção de insulina pelas células  $\beta$  pancreáticas (PICKUP & GARETH, 1991).

Em nossos experimentos a queda ( $P < 0,05$ ) da glicemia promovida pela clorpropamida, tanto em animais alimentados (redução de 44,8%) como em jejum (redução de 59,6%), mostra que este modelo pode ser empregado na averiguação de PNBAs capazes de atuar como secretagogos de insulina (**Figura 2**). SARKAR *et al.* (1996), observaram redução semelhante (40-44%) da glicemia, 1 hora após a administração de tolbutamida (sulfoniluréia), em ratos Wistar normais que receberam uma sobrecarga de glicose via subcutânea.

É interessante observar que a avaliação da glicemia e não a avaliação da insulinemia constitui um parâmetro mais seguro para avaliar um PNBA com potencial antidiabético via estímulo da secreção de insulina, principalmente quando se trabalha com extrato bruto. Isto porque a glicose (principal secretagogo de insulina), a amilose e outros carboidratos, eventualmente presentes no extrato vegetal, podem elevar a insulinemia via maior oferta de glicose para a corrente sanguínea.

No experimento onde empregamos insulina, em condições semelhantes a clorpropamida descrita anteriormente, a redução da glicemia promovida por este fármaco (**Figura 3**) em ratos Wistar alimentados (36,8%) e em jejum (46,2%) foi semelhante à geralmente observada em humanos (HOLMAN & TURNER, 1991). Estes resultados mostram que ratos Wistar podem constituir modelos experimentais para busca de novos PNBA com mecanismos de ação semelhantes aos da insulina.

É importante observar que uma diferenciação da queda da glicemia por um mecanismo “*insulin like*” x “*sulfonylurea like*” para um PNBA, poderia ser obtido via, não dosagem de insulina, mas de peptídeo C. Isto porque para cada molécula de insulina secretada pelas células  $\beta$  pancreáticas, em resposta a um agente estimulador (por exemplo, uma sulfoniluréia), uma molécula de peptídeo C também é liberada na corrente sanguínea, enquanto que a insulina exógena reduz a secreção de peptídeo C, via redução da glicemia.

Para o ser humano o teste de tolerância à glicose (TTG) é recomendável quando não há sintomas sugestivos de diabetes, mas a glicemia de jejum se apresenta entre 110 e 125 mg/dL (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 1997). Além disso, este teste é muito empregado em pesquisa utilizando animais,

inclusive na avaliação de novos fármacos (SARKAR *et al.*, 1996; ARAI *et al.*, 1999; PUSHPARAJ *et al.*, 2001; DERIVI *et al.*, 2002), já que demonstra, com maior sensibilidade, as alterações na regulação da glicemia.

A realização de TTG usando diferentes vias de administração de glicose pode ajudar na definição do mecanismo de ação de uma determinada droga. Por exemplo, ARAI *et al.* (1999) verificaram que certas frações do extrato etanólico de folhas de *Eugenia uniflora* são capazes de inibir a elevação da glicemia em camundongos, quando o TTG é realizado por via intragástrica (IG), mas não apresentam o mesmo efeito quando se utiliza a via intraperitoneal (IP). Estes resultados, segundo os autores, contribuíram para a conclusão de uma possível alteração na absorção da glicose em nível intestinal, promovida pela planta.

Em experimentos realizados em nosso laboratório, empregando ratos Wistar normais, verificamos que o efeito hiperglicêmico máximo ocorre em 30 minutos após a administração, oral ou intraperitoneal de glicose (dados não mostrados). Baseando-nos nestes resultados, avaliamos a glicemia dos animais empregados neste estudo, apenas para este período de tempo. Assim, observamos que, apesar de não obtermos uma diferença significativa na elevação da glicemia nos animais que receberam glicose, o extrato aquoso de CS não alterou a tolerância à glicose IG e ao contrário da crença popular, diminuiu ( $P < 0,05$ ) a tolerância à glicose IP (**Figura 4**). Esta diminuição da tolerância à glicose causada pelo CS também foi verificada por BELTRAME *et al.*, (2001). Estes autores realizando TTG intravenoso em ratos Wistar, tratados com dexametasona e/ou CS, verificaram que o extrato hidroalcoólico das folhas desta planta aumentou o grau de intolerância à glicose intravenosa promovida pela dexametasona.

A elevação da glicemia nos animais que receberam glicose não foi significativa devido a grande variabilidade deste parâmetro, definindo a necessidade de se trabalhar com um maior número de animais por grupo.

Além disso, graças à presença, neste experimento, de um grupo de animais que receberam CS via IG, sem qualquer sobrecarga de glicose, observamos que o extrato aquoso desta planta, não diminuiu, mas ao contrário do que se esperava, aumentou ( $P > 0,05$ ) a glicemia. Uma ausência de efeito do CS sobre a glicemia em ratos normais foi constatada em experimento realizado por PEPATO *et al.*, (2003). Neste trabalho os autores avaliaram o efeito de um decocto de folhas de CS sobre alguns parâmetros metabólicos, inclusive glicemia, de ratos normais e diabéticos, encontrando resultados positivos apenas nos animais diabéticos.

A indução química do DM é facilmente alcançada em ratos Wistar e tem sido empregada para o estudo de fitofármacos (SABU & KUTTAN, 2002; MAROO, *et al.*, 2002). Ratos submetidos ao tratamento com aloxana, como já anteriormente observado por diversos autores, desenvolvem um quadro de hiperglicemia (AGUIYI *et al.*, 2000; STANELY *et al.*, 2000; DHANDAPANI *et al.*, 2002).

Em nossos experimentos observamos, além da hiperglicemia, uma grande variação na concentração sérica de glicose nos ratos tratados com aloxana (**tabela B**), o que também se pôde notar nos trabalhos de RAO *et al.* (1999) e PEPATO *et al.* (2001) com ratos Wistar tratados com aloxana e STZ, respectivamente. Outra observação a partir de nossos resultados foi a morte de parte dos animais que receberam aloxana (**Tabela B**). De acordo com nossos resultados DIXON *et al.* (1999) observaram que o efeito tóxico da aloxana sobre as células  $\beta$ -pancreáticas de porcos envolve a liberação massiva de insulina,

responsável pela intensa hipoglicemia que pode levar à morte. Ainda segundo DIXON *et al.* (1999), esta hipoglicemia pode ser tratada, evitando-se a morte do animal, através da disponibilização de ração *ad libitum* e administração intravenosa de glicose.

Esta grande variação da glicemia gerou a necessidade de um pareamento (distribuição homogênea) dos ratos (**Tabela C**) a serem submetidos ao tratamento.

Quando usamos ratos Wistar diabéticos para avaliar o efeito do CS sobre a glicemia após tratamento por cinco dias e deparamos com uma redução deste parâmetro bioquímico, tanto em animais tratados como em animais controles, que receberam água (**Figura 5**), percebemos que houve reversão parcial do quadro diabético. Estes resultados vêm de encontro aos relatos de outros estudos mostrando a possível reversão espontânea do diabetes aloxânico em ratos (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997). Entretanto nossos resultados com CS em ratos Wistar diabéticos aloxânicos foram diferentes dos obtidos por PEPATO *et al.* (2003) em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina. Estes autores observaram que o tratamento destes animais, com o decocto de folhas de CS, melhorou diversos parâmetros metabólicos alterados pelo diabetes.

## **5.2 Modelos experimentais para estudos de PNBAs com potencial hipolipemiante**

Vários componentes do metabolismo lipídico de ratos são diferentes da espécie humana. Por exemplo, a falta de proteína transferidora de éster de colesterol (PTEC) e a utilização das HDLs como transportadoras mais importantes do colesterol plasmático. Estas diferenças têm levado a opiniões conflitantes entre



os autores quanto ao emprego desta espécie como modelo experimental para estudos de fármacos hipolipemiantes. DAY *et al.* (1978), relataram que apesar de ratos serem usados extensivamente para avaliar o efeito de compostos sobre a colesterolemia total e trigliceridemia, estes animais deveriam ser empregados apenas na procura de compostos que elevassem os níveis de HDL. KRAUSE & NEWTON (1995), concluíram que ratos normais podem ser usados em estudos pré-clínicos com inibidores de HMG-CoA redutase, desde que os resultados de redução da trigliceridemia, observados com este fármaco no rato, correlacionem-se com a redução de colesterol em outras espécies, tais como coelho e cobaio.

Quanto à pesquisa de compostos naturais, principalmente de origem vegetal, observa-se atualmente, um amplo emprego do rato como modelo animal na procura de compostos com possíveis efeitos hipolipemiantes, inclusive sem comparação com qualquer outro agente hipolipemiante padrão (RASEKH *et al.*, 2001; ANILA & VIJAYALAKSHMI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002a; OLIVEIRA *et al.*, 2002b).

A berinjela ou *Solanum melongena* (SM) foi o PNBA testado em nossos modelos experimentais para pesquisa de novos agentes hipolipemiantes. Este vegetal tem sido empregado popularmente no tratamento de dislipidemia e existem relatos sobre um possível efeito hipolipidêmico em humanos e animais de laboratório (GUIMARÃES *et al.*, 2000; JORGE *et al.*, 1998), incluindo ratos (SUDHEESH *et al.*, 1997).

Para a padronização de modelos experimentais nos estudos de PNBA com potencial hipolipemiante, começamos com um modelo experimental em ratos Wistar normais, alimentados com dieta padrão para avaliar potenciais fármacos inibidores da absorção de gorduras da dieta. Empregamos o Reducal<sup>®</sup>, um

complexo alimentar a base de extrato de fibras de conchas de crustáceos (Quitosana) e ácido ascórbico, para avaliar a interferência deste na elevação da trigliceridemia após a administração de uma fonte de gordura animal (**Figura 6**).

A quitosana, uma forma desacetilada da quitina, constitui um abundante produto polimérico de biossíntese natural, especialmente em crustáceos. Comportam-se como fibras dietéticas, já que não são digeridas pelas enzimas gastrintestinais humanas. Quando em ambientes ácidos como no estômago animal, a quitosana, através de sua carga positiva, liga-se a moléculas carregadas negativamente, como as gorduras, dificultando a sua absorção e contribuindo, desta forma, para reduzir a lipemia. A associação de quitosana com ácido ascórbico tem efeito sinérgico na diminuição da absorção de gorduras no trato gastrointestinal (KANAUCHI *et al.*, 1995). CHIANG *et al.* (2000) em um experimento usando ratos (Sprague-Dawley) alimentados com dieta enriquecida com colesterol e quitosanas de baixa e alta viscosidade, observaram uma ação hipocolesterolêmica das quitosanas independente das diferenças no grau de viscosidade.

Segundo o fabricante, o Reducal<sup>®</sup> tem a capacidade de absorver várias vezes o seu peso em gordura e devido à associação com o ácido ascórbico, é capaz de diminuir em 50% a absorção das gorduras ingeridas na dieta, auxiliando no controle de peso e níveis sanguíneos de colesterol.

Em nossos experimentos o Reducal<sup>®</sup> inibiu em 34,5% ( $P < 0,05$ ) a elevação da trigliceridemia promovida pela GB (**Figura 6**). Assim este composto poderia ser empregado como controle positivo, em experimentos com novos PNBA's que atuem como inibidores da absorção de gorduras de origem animal provenientes da dieta, em ratos Wistar normais.

Como encontramos dificuldade em reproduzir os resultados anteriormente descritos ao adquirirmos novo lote de GB (dados não mostrados), decidimos substituir a gordura de origem animal por outra vegetal, quando observamos (**Figura 7**) elevação ( $P < 0,05$ ) da trigliceridemia, em resposta à administração da gordura vegetal (OSC). De acordo com nossos resultados ARAI *et al.*, (1999) obtiveram níveis significativamente elevados de triacilglicerol no soro de camundongos, empregando óleo de milho.

Em nossos experimentos o Reducal<sup>®</sup> não foi capaz de impedir a elevação da trigliceridemia promovida pelo OSC (**Figura 7**), sugerindo que este composto, mesmo em elevadas doses (500 mg/Kg), não afeta a absorção de gordura de origem vegetal em ratos Wistar. Porém, ORMROD *et al.* (1998), avaliando o efeito da quitosana sobre a colesterolemia de camundongos *knockout*, deficientes em apolipoproteína-E (animais que apresentam níveis de colesterol 7 a 10 vezes maiores que os camundongos normais sem a necessidade de alterações na dieta), demonstraram que este composto foi capaz de reduzir as concentrações séricas de colesterol através da ligação com outros lipídeos da dieta que não colesterol.

A falta de um efeito inibidor do Reducal<sup>®</sup> na absorção de gordura vegetal nos levou a substituí-lo por um outro produto com maior potência farmacológica, o orlistat (Xenical<sup>®</sup>). Este medicamento, previamente aprovado para o tratamento da obesidade, impede a hidrólise do triacilglicerol, através da inativação das lipases gastrintestinais, fazendo com que parte da gordura da dieta não seja absorvida (KELLEY & JNEIDI, 2002). WIERZBICKI *et al.* (2002) trabalhando com indivíduos hiperlipidêmicos e submetidos à terapia convencional, verificaram redução na trigliceridemia quando orlistat foi adicionado ao tratamento destes pacientes. Em

nossos estudos o Xenical<sup>®</sup> foi capaz de impedir ( $P < 0.05$ ), em aproximadamente 50%, a elevação da trigliceridemia em animais que receberam sobrecarga de OSC, quando comparados aos controles que receberam apenas OSC (**Figura 8**). Porém, o PNBA avaliado neste modelo, ou seja, o extrato seco de SM-H, não foi capaz de impedir a elevação da trigliceridemia em ratos que receberam OSC (**Figura 8**), provavelmente por não agir de forma semelhante ao orlistat, ou seja, por não inibir as lipases gastrintestinais nesta linhagem de ratos.

Embora a SM-H não tenha apresentado efeito inibidor da elevação da trigliceridemia pós-administração de OSC, constatamos que o Xenical<sup>®</sup> constitui excelente controle positivo em experimentos, empregando ratos Wistar, nos quais se pretende investigar esse tipo de atividade biológica de outros PNBA's.

Pacientes com diabetes apresentam, com alta frequência, dislipidemia, a qual pode contribuir significativamente para a DAC, a principal causa de morte nestes pacientes (GARG, 1998). Em ratos o diabetes também está, geralmente, associado a uma dislipidemia, propiciando desta forma a construção de modelos de estudo em alterações do metabolismo lipídico (MATHÉ, 1995).

Em condições normais a insulina ativa a lipoproteína lipase e conseqüentemente a hidrólise de triglicérides. Porém, em indivíduos com deficiência de insulina há falhas na ativação desta enzima o que justifica a hipertrigliceridemia (SHARMA *et al.*, 1997).

Quando mantemos ratos diabéticos por vários dias antes de empregá-los em modelos para estudos de fármacos com potencial hipolipemiante, ficamos sujeitos ao problema de reversão do DM, principalmente relacionado ao uso de aloxana (CHATTOPADHYAY *et al.*, 1997). Apesar deste problema optamos pelo uso

da aloxana devido ao menor custo e maior estabilidade desta em relação a estreptozotocina.

Nós observamos ainda que, a reversão parcial do DM acontece mesmo após o 30º dia da administração de aloxana, sugerindo que o período de 15 dias, adotado por alguns autores (STANELY *et al.*, 2000; MAROO *et al.*, 2002; RAO *et al.*, 2003), após a administração da aloxana, parece não ser suficiente para estabilização das condições diabéticas.

Em nosso estudo observamos alterações na trigliceridemia em ratos alimentados com ração padrão, após 30 dias da administração de uma única dose de aloxana (40 mg/Kg). Entretanto não observamos alterações significativas na colesterolemia destes animais (resultados não apresentados). Em contraste RAO *et al.* (1999) obtiveram concentrações séricas significativamente elevadas de colesterol e triacilglicerol em ratos Wistar com DM induzida por aloxana, alimentados com dieta padrão, durante 30 dias após a administração de uma dose intraperitoneal de aloxana. Da mesma forma RASEKH *et al.* (2001) obtiveram elevação na colesterolemia e trigliceridemia em ratos Wistar diabéticos, entretanto, estes foram alimentados com uma dieta suplementada com alta concentração de gordura, 1% de colesterol e 5% de ácido cólico, durante 20 dias após a diabetização com STZ.

Como exemplo de investigação de potencial hipolipemiante de PNBA com emprego de modelo experimental de dislipidemia diabética, trabalhamos com a SM-H. Assim, ratos diabéticos foram mantidos por 30 dias antes do início do tratamento com PNBA, para se obter hipertrigliceridemia. Entretanto durante este período observamos decréscimo da glicemia. Portanto a aparente redução da glicemia observada após o tratamento com PNBA (**Tabela 1**), revela apenas uma melhora natural do quadro diabético. Este modelo foi interessante também para

mostrar a grande redução da glicemia que ocorre em ratos com DM induzido por aloxana e em jejum, dificultando a avaliação de resposta ao PNBA testado, em animais nestas condições (**Tabela 2**). Para contornar este problema, avaliamos a glicemia dos animais alimentados no último dia de tratamento e os submetemos a um jejum para avaliarmos a trigliceridemia no dia seguinte.

A redução da trigliceridemia observada nos ratos diabéticos tratados com SM-H e nos diabéticos controles (**Figura 9**), revela que esta redução é conseqüente à reversão parcial do diabetes e não ao efeito da SM-H. Esta reversão induziu a normalização da trigliceridemia (média = 75,87 mg/dL) nos animais do grupo controle, limitando o emprego deste modelo nas avaliações de PNBAs com potencial hipolipemiante.

A sinvastatina pertence ao grupo das estatinas e como os demais representantes do grupo atuam inibindo a HMG-CoA redutase, uma enzima chave na biossíntese de colesterol. As estatinas apresentam substancial efeito redutor de colesterol total, LDL e em menor grau de triacilglicerol em humanos (BERTOLINI & BAZOTTE, 2001). Atualmente está bem estabelecido que em ratos normais, alimentados com rações padrões, as estatinas, apesar de inibirem a HMG-CoA redutase, não reduzem a concentração de colesterol plasmática, mas reduzem a trigliceridemia, através da inibição da secreção hepática de VLDL (KRAUSE & NEWTON, 1995).

O uso dos fibratos, como o ciprofibrato, em humanos resulta em diminuição da concentração plasmática de lipoproteínas ricas em triacilglicerol, como as VLDLs e também na elevação da concentração plasmática de HDL. Atuam como ativadores dos receptores ativados por proliferadores de peroxossima (PPAR), reduzindo a expressão gênica da apolipoproteína C-III hepática e aumentando

aquela da lipoproteína lipase, com conseqüente diminuição do VLDL, além do aumento da expressão gênica das apolipoproteínas A-I e A-II, responsáveis pelo aumento de HDL (STAELS *et al.*, 1998). Em ratos alimentados com dieta padrão, os fibratos não reduzem a produção de VLDLs ricas em triacilglicerol. Entretanto existem relatos de diminuição de colesterol plasmático em virtude do tratamento com fibratos, principalmente em ratos machos (KRAUSE & PRINCEN, 1998).

No modelo experimental empregando ratos normais e fármacos hipolipemiantes, ou seja, sinvastatina e ciprofibrato, constatamos (**Tabela 3**) um efeito diferente do esperado em humanos. A sinvastatina empregada na dose de 10 mg/Kg/dia, elevou ( $P > 0,05$ ) a colesterolemia e o ciprofibrato (10mg/Kg/dia) reduziu ( $P < 0,05$ ) a colesterolemia. Estes resultados confirmam que estes fármacos apresentam, em ratos, um efeito diferente do observado em humanos, como já relatado por alguns autores (KRAUSE & PRINCEN, 1998). Portanto em ratos Wistar, a sinvastatina e o ciprofibrato poderão ser aplicados em estudos de PNBA com potencial hipolipemiante, desde que se leve em consideração esta diferença de resposta, ou seja, o rato poderá ser usado em triagens de PNBA capazes de alterar as concentrações lipídicas. Entretanto estes resultados poderão não ser completamente extrapoláveis para humanos.

FUJIOKA *et al.* (1995) observaram um efeito hipercolesterolêmico e hipotrigliceridêmico em ratos quando estes foram tratados, por vários dias, com altas doses de um outro representante do grupo das estatinas, a pravastatina. Como estávamos à procura de um controle positivo para averiguação do efeito hipotrigliceridêmico em ratos, repetimos este modelo de tratamento crônico elevando a dose de sinvastatina (100mg/Kg). Nossos resultados demonstraram uma redução ( $P > 0,05$ ) na trigliceridemia e um aumento ( $P > 0,05$ ) na colesterolemia (**Tabela 4**).

Sugerindo desta forma que para atingirmos o objetivo desejado, ou seja, definir um controle positivo para testar PNBAs com potencial hipotrigliceridêmico, em ratos Wistar normais, é possível que necessitaríamos de uma dose ainda maior de sinvastatina ou então o emprego de outro derivado do grupo, como a pravastatina, também em dose elevada (como observado por FUJIOKA *et al.*, 1995).

Na dose de 10 mg/Kg/dia a SM-H, o representante dos PNBAs testado no modelo para tratamento crônico, com ratos Wistar normais e fármacos hipolipidêmicos padrões, não acarretou (**Tabela 3**) qualquer alteração nos parâmetros lipídicos avaliados. Porém, SUDHEESH *et al.* (1997) observaram um efeito hipolipidêmico em ratos tratados com 10 mg/Kg/dia de flavonóides extraídos do fruto de SM. Portanto para correspondermos às observações destes autores, aumentamos a dose de SM-H em 10 vezes àquela usada nos experimentos anteriores (a qual estava baseada na dose utilizada em humanos), já que estávamos trabalhando com um extrato seco (total) do fruto de SM e não uma fração purificada. Entretanto, observamos que mesmo em doses maiores, a SM-H não mostrou qualquer efeito sobre a colesterolemia ou trigliceridemia (**Tabela 4**).

### **5.3 Modelo Experimental para Estudo de Toxicidade Aguda de PNBAs.**

Os testes para avaliação de toxicidade de novos fármacos são imprescindíveis durante os ensaios pré-clínicos. Fármacos com potencial antidiabético e ou hipolipemiante, podem ser tóxicos e, portanto impróprios para uso em seres vivos, sendo a hepatotoxicidade um dos primeiros aspectos a ser investigado. Geralmente esta avaliação é feita através da dosagem de enzimas conhecidas como marcadores da função hepática, tais como: AST e ALT.



Ao avaliarmos o efeito de altas doses (5g/Kg) de SM-H sobre as enzimas AST e ALT, através do modelo de hepatotoxicidade empregando ratos Wistar e CCl<sub>4</sub>, não observamos qualquer alteração nos níveis séricos destas enzimas após 4 ou 24 hs da administração deste PNBA.

Porém, em nossos estudos o CCl<sub>4</sub> alterou drasticamente as concentrações séricas de AST e ALT no rato Wistar, podendo ser empregado como controle positivo de hepatotoxicidade em experimentos com PNBA.

Como o CCl<sub>4</sub> induz hepatotoxicidade aguda em ratos, poderia ser empregado também na constituição de modelos para avaliar a atividade hepatoprotetora ou anti-hepatotóxica de diversos compostos, inclusive de plantas ou seus derivados (AJITH & JANARDHANAN, 2002; AHMED *et al.*, 2002), além de auxiliar na investigação de mecanismos de hepatotoxigenicidade de algumas drogas (LI *et al.*, 2002).

## 6. CONCLUSÃO

Ratos da linhagem Wistar respondem, de modo qualitativamente semelhante ao homem, à ação de fármacos antidiabéticos como a acarbose, clorpropamida e insulina, podendo constituir modelos experimentais para avaliação de PNBA's com potencial antidiabético. Da mesma forma esta linhagem responde, de modo qualitativamente semelhante ao homem, à ação de fármacos hipolipemiantes como quitosana e orlistat, podendo assim também constituir modelos experimentais para avaliação de PNBA's com potencial hipolipemiante. Por outro lado, a resposta a sinvastatina ou ciprofibrato foi diferente da observada em humanos, mostrando que ratos Wistar poderiam ser empregados em “*screenings*” farmacológicos para avaliar PNBA's com potencial hipolipemiante desde que se leve em consideração esta diferença.

Podemos também concluir que ratos Wistar com DM induzida por aloxana, apesar de poderem apresentar reversão parcial da doença, podem constituir modelos experimentais para avaliação de PNBA's com potencial antidiabético. Porém, não são eficientes para avaliação de PNBA's com potencial hipolipemiante, já que tendem a uma normalização nas concentrações séricas de lipídeos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AGUIYI, J.C.; OBI, C.I.; GANG, S.S.; IGWEH, A.C. Hypoglycaemic activity of *Ocimum gratissimum* in rats. **Fitoterapia**, Milan, v. 71, p. 444-446, 2000.

AHMED, B.; ALAM, T.; VARSHNEY, M.; KHAN, S.A. Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the *Euphorbiaceae* family. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 79, p. 313-316, 2002.

AJITH, T.A.; JANARDHANAN, K.K. Antioxidante and antihepatotoxic activities of *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 81, p. 387-391, 2002.

ALLAIN, C.C.; POON, L.S.; CHAN, C.S.; RICHMOND, W.; FU, P.C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 20, p. 470-475, 1974.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Expert Committee on the Diagnosis and Classifications of Diabetes Mellitus: Report of expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, New York, v. 20, n. 7, p. 1183-1197; Jul; 1997.

ANILA, L.; VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Emblca officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.79, p.81-87, 2002.

ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 68, p. 307-314, 1999.

ATTELE, AS; ZHOU, YP; XIE, JT; WU, JA; ZHANG, L; DEY,L; PUGH,W; RUE, PA; POLONSKY, KS; YUAN, CS. Antidiabetic effects of *Panax ginseng* berry extract and the identification of an effective component. **Diabetes**, Paris, v. 51, n. 6, p. 1851-1858, Jun; 2002.

AUGUSTI, K.T.; ARATHY, S.L.; ASHA, R.; RAMAKRISHANAN, J.; ZAIRA, J.; LEKHA, V.; SMITHA, S.; VIJAYASREE, V.M. A comparative study on the beneficial effects of garlic (*Allium sativum* Linn), amla (*Emblca Officinalis* Gaertn) and onion (*Allium cepa* Linn) on the hyperlipidemia induced by butter fat and beef fat in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 39, n. 8, p. 760-766; Aug; 2001.

BARILE, M.F.; GRABOWSKI, M.W.; SNOY, P.J.; CHANDLER, D.K. Superiority of the chimpanzee animal model to study the pathogenicity of known *Mycoplasma pneumoniae* and reputed mycoplasma pathogens. **Israel Journal of Medical Sciences**, Jerusalém, v. 23, n. 6, p. 556-60, Jun; 1987.

BELTRAME, F.L.; SARTORETTO, J.L.; BAZOTTE, R.B.; CUMAN, R.N.; CORTEZ, D.A.G.; FERNANDES L.C.; TCHAIKOVSKI, O. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 6, p. 783-785, nov/dez; 2001.

BERGMEYER, H.U.; BERNT, E. Determination of glucose with glucose-oxidase and peroxidase. In: BERGMEYER, H.U. (Ed). **Methods of Enzymatic Analyses**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Verlag Chemie/Academic Press, 1974, p. 1205-1215.

BERGMEYER, H.U.; SCHEIBE, P.; WAHLEFELD, A. W. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 24, p. 58-73, 1978.

BERTOLINI, G.L.; BAZOTTE, R.B. Fármacos hipolipemiantes. In: **Entendendo a gordura - os ácidos graxos**. Barueri, SP, Brasil: Manole. 2002, cap. 35, p. 493-508.

BISGAIER, C.L.; ESSENBURG, A.D.; BARNETT, B.C.; AUERBACH, B.J.; HAUBENWALLNER, S.; LEFF, T.; WHITE, A.D.; CREGER, P.; PAPE, M.E.; REA, T.J.; NEWTON, R. A novel compound that elevates high-density lipoprotein and activates the peroxisome proliferator activated receptor. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 39, p. 17-30, 1998.

BLONDEL, O.; BAILBE, D.; PORTHA, B. Relation of insulin deficiency to impaired insulin action in NDM TIPO 1 adult rats given streptozotocin as neonates. **Diabetes**, Paris, v. 38, n. 5, p. 610-617, May, 1989.

BLONDEL, O.; PORTHA, B. Early appearance of in vivo insulin resistance in adult streptozotocin-injected rats. **Diabete & Metabolisme**, Paris, v. 15, n. 6, p. 382-387, Nov-Dec; 1989.

BONNER-WEIR, S.; TRENT, D.F.; HONEY, R.N.; WEIR G.C. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. **Diabetes**, Paris, v. 30, n. 1, p. 64-69, Jan; 1981.

BRASIL. Lei que estabelece normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais e determina outras providências. Lei 6.638, de 08 de maio de 1979. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

BRASIL. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil: promulgada em 5 de outubro de 1988:atualização até Emenda Constitucional nº20, de 15.12.1998. 21 ed. São Paulo:Saraiva, 1999.

BREUER, H. M. Hypertriglyceridemia: a review of clinical relevance and treatment options: focus on cerivastatin. **Current Medical Research and Opinion**, Newbury, v.17, n.1, p.60-73, 2001.

BUCOLO, G.; DAVID, H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 19, p. 476-482, 1973.

BUSCHARD, K. Diabetic animal models. **APMIS**, Kobenhavn, v. 104, n. 9, p.609-14, Sep; 1996.

BUSCHARD, K. A pragmatic answer to the use of animal models for type 1 diabetes. **Diabetes/Metabolism Reviews**, New York, v. 14, p. 192-193, 1998.

CARNAUD, C. The contribution of animal models to the understanding of the pathogenesis of type 1 diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 8, p. 925-929, 1995.

CARNEY, J.R.; KRENISKY, J.M.; WILLIAMSON, R.T.; LUO, J. Achyrofuran, a new anthyperglycemic dibenzofuran from the South American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 65, n. 2, p. 203-205, Feb; 2002.

CETTO, A.A.; WIEDENFELD, H.; REVILLA, M.C.; SERGIO, I.A. Hypoglycemic effect of *Equisetum myriochaetum* aerial parts on streptozotocin diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, vol. 72, p. 129-133, 2000.

CHAKRABARTI (a), R.; VIKRAMADITHYAN, R.K.; KUMAR, M.P.; KUMAR, S.K.; MAMI, N.V.; MISRA, P.; SURESH, J.; HIRIYAN, J.; RAO, C.S.; RAJAGOPALAN, R. PMT13, a pyrimidone analogue of thiazolidinedione improve insulin resistance-associate disorders in animal models of type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 319-328, Sep; 2002.

CHAKRABARTI (b), R.; VIKRAMADITHYAN, R.K.; MULLANGI, R.; SHARMA, V.M.; JAGADHESHAN, H.; RAO, Y.N.; SAIRAM, P.; RAJAGOPALAN, R. Antidiabetic and Hypolipidemic activity of *Helicteres isora* in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 81, p. 343-349, 2002.

CHATTOPADHYAY, S.; RAMANATHAN, M.; DAS, J.; BHATTACHARYA, S.K. Animal models in experimental diabetes mellitus. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 35, p. 1141-1145, Nov; 1997.

CHETA, D. Animal models of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, London, v. 11, n. 1, p. 11-19, Jan-Feb; 1998.

CHIANG, M.T.; YAO, H.T.; CHEN, H.C. Effect of dietary chitosans with different viscosity on plasma lipids and lipid peroxidation in rats fed on a diet enriched with cholesterol. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 64, n.5, p. 965-971; May, 2000.

CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.; LAAKSO, M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomized trial. **Lancet**, New York, v. 359, p. 2072-2077; Jun; 2002.

CLINE, G.W.; JOHNSON, K.; REGITTNIG, W.; PERRET, P.; TOZZO, E.; XIAO, L.; DAMICO, C.; SHULMAN, G.I. Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. **Diabetes**, Paris, v. 51, n. 10, p. 2903-2910, 2002.

CRAIG, W. Relevance of animal models for clinical treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, vol. 12 (Suppl 1), p. 55-57, 1993.

DAY, C.E.; SCHURR, P.E.; PHILLIPS, W.A. Selected animal models for systematic anti-atherosclerotic drug development. **Advances in Experimental Medicine Biology**, New York, v. 109, p. 277-283, 1978.

DERIVI, S.C.N.; MENDEZ, M.H.M.; FRANCISCONI, A.D.; SILVA, C.S.; CASTRO, A.F.; LUZ, D.P. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*, L.) em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 164-169, maio-ago; 2002.

DHANDAPANI, S.; SUBRAMANIAN, V.R.; RAJAGOPAL, S.; NAMASIVAYAM, N. Hypolipidemic effect of *Cuminum cyminum* L. on alloxan-induced diabetic rats. **Pharmacological Research**, London, v. 46, n. 3, p. 251-255, 2002.

DIXON, J.L.; STOOPS, J.D.; PARKER, J.L.; LAUGHLIN, M.H.; WEISMAN, G.A.; STUREK, M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, Hagerstow vol. 19, p. 2981-2992, 1999.

DJAHANSOUZI, S.; BRAESEN, J.H.; KOENIG, K.; BEISIEGEL, U.; KONTUSH, A. The effect of pharmacological doses of different antioxidants on oxidation parameters and atherogenesis in hyperlipidaemic rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 154, n. 2, p. 387-398; Feb; 2001.

DORMEHL, I.C.; HUGO, N.; BEVERLEY, G. The baboon: an ideal model in biomedical research. **Anesthesia & Pain Control in Dentistry**, Bethesda, v.1, n.2, p.109-115, Spring, 1992.

DRAIJER, R.; VOLGER, O.L.; DAHLMANS, V.E.; deWIT, E.C.; HAVEKES, L.M.; PRINCEN, H.M. HOE 402 lowers serum cholesterol levels by reducing VLDL-lipid production, and not by induction of the LDL receptor, and reduces atherosclerosis in wild-type and LDL receptor-deficient mice. **Biochemical and Pharmacology**, Luxemburg, v. 63, n. 9, p. 1755-1761; May, 2002

EYNON, E.E.; FLAVELL, R..A. Walking through the forest of transgenic models of human disease. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 169, p.5-10, Jun; 1999.

FEDERLIN, K.; BECKER, F. Specific therapeutic attempts in experimental and clinical type-I diabetes. **Klinische Wochenschrift**, Heidelberg, v. 68. suppl. 21, p. 38-43, 1990.

FUJIOKA, T.; NARA, F.; TSUJITA, Y.; FUKUSHIGE, J.; FUKAMI, M.; KURODA, M. The mechanism of lack of hypocholesterolemic effects of pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1254, p. 7-12, 1995.

GARG A. Treatment of diabetic dislipidemia. **The American Journal of Cardiology**, New York, v. 81, n. 4A; Feb; 1998.

GOLDENBERG, S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, vol. 15, n. 4, p. 193-194, 2000.

GORINSTEIN S.; LEONTOWICZ, H.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; KRZEMINSKI, R.; GRALAK, M.; CZERWINSKI, J.; JASTRZEBSKI, Z.; TRAKHTENBERG, S.; GRIGELMO-MIGUEL, N.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTIN-BELLOSO, O. Olive oils improve lipid metabolism and increase antioxidant potential in rats fed diets containing cholesterol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC., v. 50, n. 21, p. 6102-6108; Oct; 2002.

GOTTLIEB, P.A; EISENBARTH, G.S. Mouse and man: multiple genes and multiple autoantigens in the aetiology of type I DM and related autoimmune disorders. **Journal of Autoimmunity**, London, v. 9, p. 277-281, 1996.

GREINER, D.L.;ROSSINI A.A.; MORDES J.P. Translating data from animal models into methods for preventing human autoimmune diabetes mellitus: *Caveat Emptor and primum non nocere*. **Clinical Immunology**, Orlando, vol. 100, n. 2, p. 134-143, 2001.

GUIMARÃES, P. R.; GALVÃO, A.M.P.; BATISTA, C.M.; AZEVEDO, G.S.; OLIVEIRA, R.D.; LAMOUNIER, R.P.; FREIRE, N.; BARROS, A.M.D.; SAKURAI, E.; OLIVEIRA, J.P.; VIEIRA, E.C. e ALVAREZ-LEITE, J.I. Eggplant (*Solanum melongena*) infusion has a modest and transitory effect on hypercholesterolemic subjects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.33, n.9, p.1027-1036, 2000.

HOLMAN, R.R.; TURNER, R.C. Oral agents and insulin in the treatment of NIDDM. In: PICKUP, J.; WILLIAMS, G. (Ed.). **Text book of diabetes**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991, v. 1, cap.48, p. 462-469.

HOOFFAR, J.; BUSCHARD, K.; BROGEN, C.H. Impact of dietary protein and fat source on the development of insulin-dependent diabetes in the BB rat. **Diabetes Research**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 33-41, 1992.

HORAK, J.; CUPARENCO, B.; HORAK, A. Acute effects of zopiclone on blood glucose level and serum lipids in hyperlipidemic rats. Interactions with PK 11195 and flumazenil. **Acta Physiologica Hungarica**, Budapest, v. 87, n. 2, p. 185-192, 2000.

JORGE, P.A. R.; NEYRA, L.C.; OSAKI, R.M.; ALMEIDA, E. e BRAGAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v.70, n.2, p.87-91, 1998.

JOSHI, R.L; LAMOTHE, B.; BUCCHINI, D.; JAMI, J. Genetically engineered mice as animal models for NDM TIPO 1. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 401, p. 99-103, 1997.



KAMESWARA, R.B.; KESAVULU, M.M.; APPARAO Ch. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, vol. 78, p. 67-71, 2001.

KANAUCHI, O.; DEUCHI, K.; IMASATO, Y.; SHIZUKUISHI, M.; KOBAYASHI, E. Mechanism for the inhibition of fat digestion by chitosan and for the synergistic effect of ascorbate. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 59, n. 5, p. 786-790; May, 1995.

KELLEY, D.E.; JNEIDI, M. Orlistat in the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, London v. 3, n. 2, p. 599-605; May, 2002.

KIMURA, M.; WAKI, I.; CHUJO, T.; KIKUCHI, T.; HIYAMA, C.; YAMAZAKI, K.; TANAKA, O. Effects of hypoglycemic components in ginseng radix on blood insulin level in alloxan diabetic mice and insulin release from perfused rat pancreas. **Journal of Pharmacobio-dynamics**, Tokyo, v. 4, p. 410-417, 1981.

KLOETZEL, J.K.; SILVA, J.A.P.; SILVA-FILHO, M.R.; SOGAYAR, R. Uso de animais de laboratório. **Anais da 48ª Reunião Anual da SBPC**, São Paulo, vol. 1, p 65-72, 1996.

KOLETSKY, S. Obese spontaneously hypertensive rats. A model for the study of atherosclerosis. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego v. 19, p. 53-60, 1973.

KRAUSE, B.R.; BARNETT, B.C.; ESSENBURG, A.D.; KIEFT, K.A.; AUERBACH, B.J.; BOUSLEY, R.; STANFIELD, R.; NEWTON, R.S.; BISGAIER, C.L. Opposite effects of bezafibrate and gemfibrozil in both normal and hypertriglyceridemic rats. **Atherosclerosis**, Limerick, vol. 127, p. 91-101, 1996.

KRAUSE, B.R.; NEWTON, R.S. Lipid-lowering activity of atorvastatin and lovastatin in rodent species: triglyceride-lowering in rats correlates with efficacy in LDL animal models. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 117, p. 237-244, 1995.

KRAUSE, B.R.; PRINCEN, H.M.G. Lack of predictability of classical animal models for hypoglycemic activity: a good time for mice? **Atherosclerosis**, Limerick, v. 140, p. 15-24, 1998.

LEIBOWITZ, G.; UCKAYA, G.; OPRESCU, A.I.; CERASI, E.; GROSS, D.J.; KAISER, N. Glucose-regulated proinsulin gene expression is required for adequate insulin production during chronic glucose exposure. **Endocrinology**, Oxford, v. 143, n. 9, p. 3214-32, Sep; 2002.

LEIVINGSTON, J.N. Genetically engineered mice in drug development. **Internal Medicine**, Tokyo, v. 245, n. 6, p. 627-35, Jun; 1999.

LI, J.; KENEKO, T.; WANG, Y.; QIN, L.Q.; WANG, P.Y.; SATO, A. Troglitazone enhances the hepatotoxicity of acetaminophen by inducing CYP3A in rats. **Toxicology**, Kidlington, v. 176, p. 91-100, 2002.

LIU, H.H.; KO, W.C.; HU, M.L. Hypolipidemic effect of glycosaminoglycans from the sea cucumber *Metriatyla scabra* in rats fed a cholesterol-supplemented diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 12, p. 3602-3606; Jun; 2002.

LOHMANN T. Limitations of animal models for studying type 1 diabetes. **Diabetes/Metabolism Reviews**, New York, v. 14, p. 192, 1998.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM, T.I.; PINTO, A.S.; MAIA, J.R.S.; TINOCO, A.L.A.; MORAES, G.H.K.; SILVA, R.R. Efeito de diferentes doses de rutina sobre lípidos no soro de coelhos machos e fêmeas. **Revista Portuguesa de Farmácia**, Lisboa, v. LI, n. 4, p. 157-162. out; nov; dez; 2001.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKA, Y.; KATAGIRI, K. Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse. **Experimental animal**, Tokyo, v. 30, p. 137, 1981.

MAKINO, S.; KUNIMOTO, K.; MURAOKO, Y.; MIZUSHIMA, Y.; KATAGIRI, K.; TOCHINO, Y. Breeding of a non-obese diabetic strain of mice. **Experimental Animal**, Tokyo, v. 29, p.1-13, 1980.

MARCONDES, J.A.M.; BACCHELLA, T.; NAHAS, W.C.; MAZUCCHI, E.; DAVIDNETO, E.; ARAP, S. Diabetes e transplante de pâncreas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5/6, p. 50F-57F, 2001.

MAROO, J.; VASU, V.T.; AALINKEEL, R.; GUPTA, S. Glucose lowering effect of aqueous extract of *Encostemma littorale* Blume in diabetes: a possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 81, n. 3, p. 317-320, 2002.

MATHÉ, D. Dyslipidemia and diabetes: animal models. **Diabete & Metabolisme**, Paris, v. 21, n. 2, p. 106-111, 1995.

MATSUOKA, N.; JINGAMI, H.; MASUZAKI, H.; MIZUNO, M.; NAKAISHI, S.; SUGA, J.; TANAKA, T.; YAMAMOTO, T.; NAKAO, K. Effects of gemfibrozil administration on very low density lipoprotein receptor mRNA levels in rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 126, n. 2, p. 221-226; Oct; 1996.

MAUVAIS-JARVIS, F.; KULKARNI, RN; KAHN, CR. Knockout models are useful tools to dissect the pathophysiology and genetics of insulin resistance. **Clinical Endocrinology**, Oxford, v. 57, p. 1-9, 2002.

MOGHADASIAN, M.H.; FROHLICH, J.J.; McMANUS, B.M. Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. **Laboratory Investigation**, Baltimore, vol. 81, n. 9, p. 1173-1183, 2001.

MOGHADASIAN, M.H. Experimental atherosclerosis: a historical overview. **Life of Science**, New York, v. 70, n. 8, p. 855-865; Jan; 2002.

NYARKO, A.K.; ASARE-ANANE, H. OFOSUHE, M.; ADDY, M.E. Extract of *Ocimum canum* lowers blood glucose and facilitates insulin release by isolated pancreatic beta-islet cells. **Phytomedicine**, Jena, v. 9, n.4, p. 346-351, May, 2002.

O'REILLY, T.; CLEELAND, R.; SQUIRES, E.L. Evaluation of antimicrobials in experimental animal infections. In: LORIAN, V. (ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 4<sup>th</sup>. ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1996. cap. 14, p. 604-765.

OHNISH, Y.; TAKAGI, S.; MIURA, T.; USAMI, M.; KAKO, M.; ISHIHARA, E.; YANO, H., TANIGANA, K.; SUNO, Y. Effect of ginseng radix on GLUT2 protein content in mouse liver in normal and epinephrine-induced hyperglycemic mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 19, p. 1238-1240, 1996.

OLIVEIRA, T.T.(a); GOMES, S.M.; NAGEM, T.J.; COSTA, N.M.B.; SECOM, P.R. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n.1, p. 45-51, 2002.

OLIVEIRA, T.T. (b); PEREIRA, W.L.; NAGEM, T.J.; PINTO, A.S.; SANTOS, C.A. Efeito regulatório de flavonóides e de carmin nos níveis de lipídeos em ratos Wistar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, n. 1, p. 24-28, 2002.

ORMROD, D.J.; HOLMES, C.C.; MILLER, T.E. Dietary chitosan inhibits hypercholesterolaemia and atherogenesis in the apolipoprotein E-deficient mouse model of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 138, p. 329-334, 1998.

PALIT, P.; FURMAN, B.L.; GRAY, A.I. Novel weight-reducing activity of *Galega officinalis* in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, n. 11, p. 1313-1319, Nov; 1999.

PAULETTO, P.; PUATO, M.; FAGGIN, E.; SARTORE, S. Low-dose cerivastatin inhibits spontaneous atherogenesis in heterozygous watanabe hyperlipidemic rabbits. **Journal of Vascular Research**, Basel, v. 37, n. 3, p. 189-194; May-Jun; 2000.

PEPATO, M.T.; BAVIERA, A.M.; VENDRAMINI, R.C.; PEREZ, Mda .P.; KETTELHUT, I.C.; BRUNETTI, I.L. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long –term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, London, v. 37, p. 15-20; Feb; 2003.

PEPATO, M.T.; FOLGADO, V.B.B.; KETTELHUT, I.C.; BRUNETTI, I.L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 389-395, 2001.

PÉREZ, C.; CANAL, J.R.; ROMERO, A.; TORRES, M.D. Experimental hypertriglyceridaemia and hypercholesterolaemia in rats. **Acta Physiologica Hungarica**, Budapest, v. 86, n. 1, p. 57-68, 1999.

PICKUP, J.C.; GARETH, W. New drugs in the management of diabetes mellitus. In: \_\_\_\_\_. **Textbook of diabetes**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1991. v. 2, cap. 104, p. 977-993.

POLLOCK, S.H.; REICHBAUM, M.I.; COLLIER, B.H.; D'SOUZA, M.J. Inhibitory effect of cyclosporine A on the activity of oral hypoglycemic agents in rats. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, Bethesda, v. 258, n. 1, p. 8-12; Jul; 1991.

PORTHA, B.; PICON, L.; ROSSELIN, G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 17, n. 6, p. 371-377, Dec; 1979.

POSPISILIK, J.A.; STAFFORD, S.G.; DEMUTH, H.U; BROWNSEY, R.; PARKHOUSE, W.; FINEGOOD, D.T.; McINTOSH, C.H.S.; PEDERSON, R.A. Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained Improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and  $\beta$ -cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. **Diabetes**, Paris, v. 51, n. 4, p. 943-950, 2002.

PUSHPARAJ, P.N.; TAN, B.K.; TAN, C.H. The mechanism of hypoglycemic action of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in streptozotocin-diabetic rats. **Life Science**, New York, v. 70, n. 5, p. 535-547. Dec; 2001.

RABINOVITCH, A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes/Metabolism Reviews**, New York, v. 14, n. 2, p. 129-151, Jun; 1998.

RAO, BK; KESAVULU, MM; GIRI, R.; RAO, Ch. A. Antidiabetic and hypolipidemic effects of *Momordica cymbalaria* Hook. Fruit powder in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 67, p. 103-109, 1999.

RAO, BK; KESAVULU, MM; RAO, Ch. A. Antihyperglycemic activity of *Momordica cymbalaria* in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 78, p. 67-71, 2001.

RAO, B.K.; SUDARSHAN, P.R.; RAJASEKHAR, M.D.; NAGARAJU, N.; RAO, Ch. A. Antidiabetic activity of *Terminalia pallida* fruit in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 85, p. 169-172, 2003.

RASEKH. H.R.; KHOSHNOOD-MANSOURKHANI, M.J.; KAMALINEJADE, M. Hypolipidemic effects of *Teucrium polium* in rats. **Fitoterapia**, Milan, v. 72, n. 8, p. 937-939, Dec; 2001.

RAYMUNDO, M.T.; GOLDIM, J.R. Pesquisa em modelos animais: proposta e diretrizes. **Revista HCPA & Faculdade de Medicina da UFRS**, Porto Alegre, vol 20, n 1, p 44-49, 2000.

REICH WT, editor. **Encyclopedia of Bioethics**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Macmillan; 1995, p.143-44.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. **Pharmacology Review**, v. 22, n. 4, p. 485-518, 1970.

ROLIN, B.; LARSEN, M.O.; GOTFREDSEN, C.F.; DEACON, C.F.; CARR, R.D.; WILKEN, M.; KNUDSEN, L.B. The long-acting GLP-1 derivate NN2211 ameliorates glycemia and increases beta-cell mass in diabetic mice. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism and Gastrointestinal Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 4, p. E745-752, Oct; 2002.

RUDEL, L.L. Pre-clinical and clinical pharmacology of a new class of lipid management agents. **American Journal of Managed Care**, Jamesburg, v. 8, suppl 2, p. S33-S35, Feb; 2002.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959. p. 46-53.

SABU, M.C.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 82, n. 2, p. 155-160, 2002.

SALIL G; RAJAMOHAN, T. Hypolipidemic and antiperoxidative effect of coconut protein in hipercolesterolemia rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.39, n.10, p. 1028-1034; Oct; 2001.

SANCHEZ, J.C.; CONVERSE, V.; NOLAN, A.; SCHIMID, G.; WANG, S.; HELLER, M.; SENNITT, M.V.; HOCHSTRASSER, D.F.; CAWTHORNE, M.A. Effect of rosiglitazone on the differential expression of diabetes-associated proteins in pancreatic islets of C57Bl/6 lep/lep mice. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 1, n. 7, p. 509-516, Jul; 2002.

SARKAR, S.; PRANAVA, M.; MARITA, R. A. Demonstration of the hypoglycemic action of *Momordica Charantia* in a validated animal model of diabetes. **Pharmacological Research**, London, v. 33, n. 1, p. 1-4. 1996.

SHAH, J.H.; PISHDAD, G. The effect of lithium on glucose-and-tolbutamide-induced insulin release and glucose tolerance in the intact rat. **Endocrinology**, Bethesda, v. 107, n. 5, p. 1300-1304; Nov; 1980.

SHARMA, S.R.; DWIVEDI, S.K.; SWARUP, D. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 58, n. 1, p. 39-44, Sep; 1997.

SHIMAZU, T. Reciprocal innervations of the liver: its significance in metabolic control. In: LUFT, P.L. (Ed.). **Advances in metabolic disorders**. New York: Academic Press, 1983, p. 355-383.

SOBEL, D.O.; AHVAZI, B.; JUN, H.S.; CHUNG, Y.H.; YOON, J.W. Cyclophosphamide inhibits the development of diabetes in the diabetes-prone BB rat. **Diabetologia**, Berlin, v. 43, n. 8, p. 986-994; Aug; 2000.

SOBEL, D.O.; GOYAL, D.; AHVAZI, B.; YOON, J.W.; CHUNG, Y.H.; BAGG, A.; HARLAN, D.M. Low dose poly I:C prevents diabetes in the diabetes prone BB rat. **Journal of autoimmunity**, London, v. 11, p. 343-352, 1998.

SONG, H.Y.; ABAD, M.M.; MAHONEY, C.P.; McEVOY, R.C. Human insulin B chain but not A chain decreases the rate of diabetes in BB rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, Shannon, v. 46, p. 109-114, 1999.

STANELY, P.; PRINCE, M.; MENON, V.P. Hypoglycaemic and other related actions of *Tinospora cordifolia* roots in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 70, p. 9 –15, 2000.

STAELS, B.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K.; LEITERSDORF, E.; FRUCHART, J.C. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. **Circulation**, Baltimore, v. 98, p. 2088-2093, 1998.

St CLAIR, W.R. Metabolic changes in the arterial wall associated with atherosclerosis in the pigeon. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 42, n. 8, p. 2480-2485; May, 1983.

SUDHEESH, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYAKUMAR, S. e VIJAYALAKSHMI, N. R. Hypolipidemic effect of flavonoids from *Solanum melongena*. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v.51, p.321-330, 1997.

SUDHEESH, S.; SANDHYA, C.; KOSHY, A. S. e VIJAYALAKSHMI, N. R. Antioxidante activity of flavonoids from *Solanum melongena*. **Phytotherapy Research**, London, n.13, p.393-396, 1999.

VOLGER, O.L.; MESINK, R.P.; PLAT, J.; HORNSTRA, G.; HAVEKES, L.M; PRINCEN, H.M. Dietary vegetable oil and wood derived plant stanol esters reduce atherosclerotic lesion size and severity in apoE\*3-Leiden transgenic mice. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 157, n. 2, p. 375-381; Aug; 2001.

WEIDNER, J. Preparation of an experimental animal model by use of a drug delivery system. **Drug Discovery Today**, Kidlington, vol. 7, n. 1, p.80-81, 2002.

WIERZBICKI, A. S.; REYNOLDS, T.M.; CROOK, M.A. Usefulness of orlistat in the treatment of severe hypertriglyceridemia. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 89, n. 15; Jan; 2002.

WOLFORD, S.T.; SCHROER, R.A.; GOHS, F.X.; GALLO, P.P.; BRODECK, M.; FALK, H.B.; RUHREN, R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, London, vol. 18, p. 161-188, 1986.

WONG, F.S.; JANEWAY Jr, C.A. Insulin-dependent diabetes mellitus and its animal models. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 11, p. 643-647, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Statement on animal use in biomedical research. Human rights and professional responsibilities of physicians. In: The world psychiatric association. Physicians, patients, society. Kiev: BPA; p.40-41, 1996.

YANG, B.C.; PHILLIPS, M.I.; MOHUCZY, D.; HONGBIN, M.; SHEN, L.; MEHTA, P.; MEHTA, J.L. Increased angiotensin II type 1 receptor expression in hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, Hagerstown, v. 18, p. 1433-1439, 1998.

YOSHIDA, N.; MURASE, H.; KUNIEDA, T.; TOYOKUNI, S.; TANAKA, T.; TERAU, J.; NAITO, Y.; TANIGAWA, T.; YOSHIKAWA, T. Inhibitory effect of a novel water-soluble vitamin E derivate on atherosclerosis in rabbits. **Atherosclerosis**, Limerick, v. 162, n. 1, p. 111-117; May, 2002.

YUAN, C.S.; WU, J.A.; LOWELL, T.; GU, M. Gut and brain effects of American ginseng root on brain-stem neuronal activities in rats. **American Journal of Chinese Medicine**, Garden City, v. 26, p. 47-55, 1998.

ZHANG, B.; SHIOMI, M.; TANAKA, H.; MEI, J.; FAN, P.; TSUJITA, Y; HORIKOSHI, H; SAKU, K. Effects of high-dose troglitaz one on insulin sensitivity and beta-cell function in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, Geneva, v. 26, n. 3, p. 185-192; Jul-Sep; 2001.

ZUCKER, L.M.; ZUCKER, T.F. Fatty a new mutation in the rat. **Journal of Heredity**, Cary, v. 52, p. 275-278, 1961.