

Avaliação da atividade Antinociceptiva da fração acetato de etila de *Cenostigma macrophyllum*.

Herton Luiz Alves Sales Filho (bolsista PIBIC/ICV), Celyane Alves Piauilino (Mestranda em Farmacologia), Mariana Helena Chaves (colaborador, Departamento de Química - UFPI), Salete Maria da Rocha Cipriano Brito (Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia - UFPI).

1- Introdução:

O *Diabetes mellitus* (DM) está associado a complicações que comprometem a produtividade, a qualidade de vida e a sobrevivência dos indivíduos. Dentre as diversas complicações clínicas do diabetes, destaca-se a neuropatia periférica - pois os tratamentos disponíveis não se mostram eficazes em aliviar a dor (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2006).

Em roedores, a neuropatia diabética se manifesta pelo menor limiar de nocicepção, sendo que a hipersensibilidade ao estímulo mecânico foi relatada por alguns autores como sendo detectável após uma semana da indução de DM com estreptozotocina (CHEN; PAN.,1998). Nesse contexto, torna-se importante conhecer os mecanismos biológicos da dor neuropática e os métodos farmacológicos de intervenção como base para a realização de estudos que visem descobrir novas abordagens terapêuticas.

Uma alternativa bastante racional é buscar novos princípios ativos entre os componentes químicos da biodiversidade. A *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire é conhecida popularmente por caneleiro, canela-de-velho, maraximbé ou fava-do-campo (FREIRE, 1994) sendo que o extrato etanólico e a fração acetato de etila das cascas desta espécie apresentaram efeitos antinociceptivos (PEREIRA et al., 2006) e antioxidantes (SOUSA et al., 2007).

2- Metodologia

Coleta e obtenção do material vegetal: as cascas de *Cenostigma macrophyllum* foram coletadas em Teresina-PI juntamente com outras partes da planta. Após a coleta, as exsiccatas foram conferidas e armazenadas no Herbário Graziela Barroso da UFPI (exsicata 10.374). O extrato etanólico (EEtOH) das cascas foi preparado a frio e submetido a partição com solventes no Laboratório de Produtos Naturais - UFPI. A fração acetato de etila (AcOEt) foi uma dos componentes obtidos a partir desse fracionamento.

Animais: cinco grupos com em média 10 ratos Wistar (250-280g) foram submetidos à injeção de estreptozotocina (STZ, 40mg/Kg de peso, iv.). Após 48h da indução do diabetes, os animais com glicemia de jejum $\geq 15\text{mM}$ foram considerados diabéticos (PEPATO et al., 2001). Os ratos diabéticos e normais foram submetidos quinzenalmente a estímulo nociceptivo mecânico com filamentos de von Frey, sendo os diabéticos separados no 28º dia de DM experimental para avaliação do efeito antinociceptivo agudo da fração AcOEt de *Cenostigma macrophyllum*. Os animais foram tratados conforme a seguir: Normais (solução fisiológica mais 2% de dimetilsulfóxido (DMSO), p.o.), Diabético-veículo (solução fisiológica mais 2% de DMSO, p.o.), Diabético- Fração 250 (250 mg/Kg da fração AcOEt, p. o.), Diabético-Fração 500 (500 mg/Kg da fração AcOEt, p. o.), Diabético-Fração 500 + naloxona (pré-tratamento 10 minutos antes com naloxona 5mg/kg i.p. e 500 mg/Kg da fração AcOEt, p. o.) e Diabético- Morfina (5mg/kg i.p. de morfina).

O limiar de resposta aos filamentos de Von frey (em g) foi determinado antes e após 60, 120 e 180 dias do tratamento por meio da aplicação de estímulo mecânico na superfície plantar da pata traseira dos animais (CHAPLAN et al, 1994). Os experimentos ocorreram de acordo com as normas do Comitê de ética animal/UFPI.

Análise estatística: Teste t de Student e ANOVA - One-way/Tukey, significância: $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão.

Os dados das glicemias caracterizam o quadro de diabetes, visto que foram superiores a dos ratos normais e maior que 270mg/dl tanto dois dias após a injeção de estreptozotocina como no final do experimento (PEPATO et al., 2001).

Tabela 1: Glicemia de jejum de ratos submetidos à indução de diabetes mellitus com estreptozotocina (STZ). As glicemias inicial e final foram avaliadas após 2 e 28 dias da indução com STZ.

Grupos	Glicemia inicial (mg/dl)	Glicemia final (mg/dl)
Normal-veículo)	100,71 ± 10,42; n=10	118,12 ± 14,73; n=10
Diabético- veículo)	433,57 ± 37,43; n=8*	313,27 ± 21,65; n=8*
Diabético-F. AcOEt 250mg/Kg, p.o	365,31 ± 27,00; n=10*	339,46 ± 46,41; n=10*
Diabético-F. AcOEt 500mg/Kg. p.o	347,14 ± 35,46; n=7*	499,84 ± 81,00; n=7*
Diabético-Morfina 5mg/Kg, iv	396,09 ± 28,87; n=9*	359,10 ± 48,77; n=9*
Diabético -F. AcOEt 500 + naloxona 5mg/Kg	356,99 ± 28,13; n=10*	333,63 ± 104,82; n=10

Os dados representam a média e o erro padrão seguido do número de animais, ANOVA, Tukey, * $p < 0,05$ vs normal.

Nos trabalhos realizados previamente por este grupo foi possível observar o estabelecimento da neuropatia dolorosa a partir da segunda semana da indução do diabetes (CARVALHO, 2009). De fato, já no 14º dia o limiar dos ratos diabéticos encontrava-se reduzido diante do estímulo mecânico. Assim o estado de alodinia caracteriza o quadro neuropático.

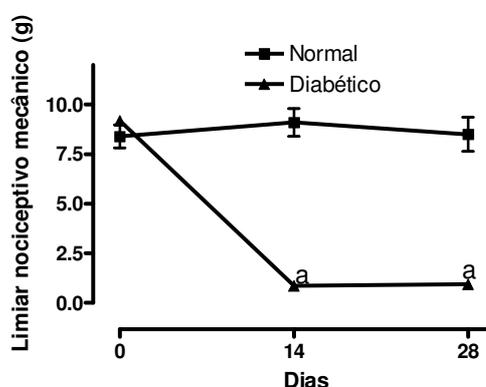


Figura 1: Limiar nociceptivo mecânico nos tempos zero, 14 e 28 dias após a indução do diabetes mellitus experimental, ^a $p < 0,05$ vs grupo normal (ANOVA one-way/ tukey).

Estabelecida a neuropatia, pariu-se no 28º do DM para investigar o efeito antinoceptivo agudo da fração acetato de etila (F. AcOEt) das cascas de *Cenostigma macrophyllum* sobre a neuropatia

diabética periférica. A fração estudada exibiu efeito antinociceptivo nesse modelo nos tempos de 120 e 180 minutos tanto na dose de 250 mg/kg como na de 500mg/kg. Contudo, a última dose mostrou-se mais eficaz no tempo final - caracterizando o efeito dose-dependente.

Tabela 2: Limiar nociceptivo mecânico no 28º dia após a indução do diabetes mellitus experimental. Os ratos foram tratados e o limiar de dor avaliado nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos. a p< 0,05 vs Normal , (b) p< 0,0 5 vs Diabético-veículo e c p<0,05 vs morfina (ANOVA one-way/ tukey).

Grupos	0	60 min	120 min	180 min
Normal (n=10)	8,50 ± 0,86;	10,50 ± 1,06;	9,30 ± 0,76;	9,50 ± 0,69;
Diabético veículo (n=8)	0,83 ± 0,12 ^a ;	0,93 ± 0,15 ^a ;	0,80 ± 0,15 ^a ;	0,93 ± 0,17 ^a
Diabético- Morfina (n=9)	0,91 ± 0,16 ^a ;	4,93 ± 1,03 ^{ab} ;	5,56 ± 0,87 ^{ab} ;	5,11 ± 0,59 ^{ab}
Diabético- F.AcOEt 250 (n=10)	0,72 ± 0,10 ^a ;	2,90 ± 0,46 ^a	3,58 ± 0,64 ^{a b}	3,66 ± 0,45 ^{ab}
Diabético -F.AcOEt 500 (n=8)	0,65 ± 0,11 ^a ;	2,15 ± 0,42 ^{ac} ;	4,5 ± 0,73 ^{ab} ;	6,25 ± 0,70 ^{ab}
Diabético -Ff. AcOEt 500 + naloxona (n=10)	1,46 ± 0,31 ^a ;	2,10 ± 0,34 ^{ac}	1,98 ± 0,74 ^{ac}	2,76 ± 1,1 ^{ac}

Os dados representam a média e o erro padrão seguido do número de animais, ap< 0,05 vs Normal , (b) p< 0,0 5 vs Diabético-veículo e c p<0,05 vs morfina (ANOVA one-way/ tukey).

A neuropatia diabética periférica é importante causa de dor crônica neurogênica em pacientes acometidos por essa síndrome metabólica, a hipótese mais aceita é que essa manifestação clínica decorre sobretudo do estado de hiperglicemia (descontrole glicêmico). Contudo, diversos estudos apontam que a insulinopenia (no *diabetes mellitus* tipo I) ou a resistência a insulina (no *diabetes mellitus* tipo II) têm também um papel coadjuvante importante nesse processo (DOBRETSOV; ROMANOVSKY; STIMERS, 2007).

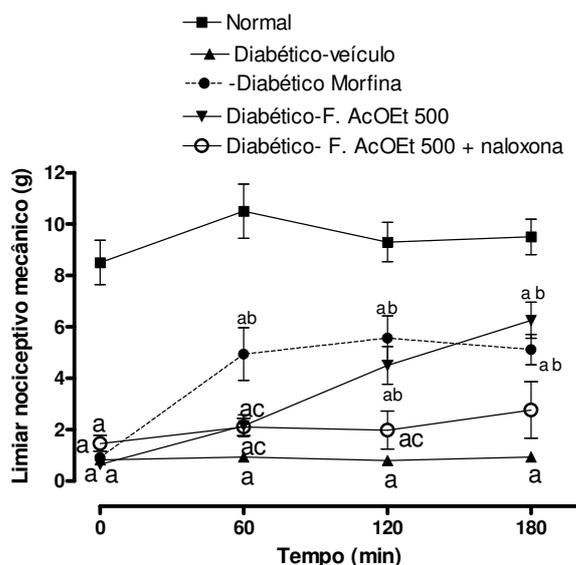


Figura 2: Limiar nociceptivo mecânico no 28º dia após a indução do diabetes mellitus experimental. Os ratos foram tratados e o limiar de dor avaliado nos tempos 0, 60, 120 e 180 minutos. a p< 0,05 vs Normal , (b) p< 0,0 5 vs Diabético-veículo e c p<0,05 vs morfina (ANOVA one-way/ tukey).

Esses resultados corroboram para ação antinociceptiva da fração descrita em outros modelos de nocicepção experimental (PEREIRA et al., 2006). O pré-tratamento com naloxona aboliu o efeito antinociceptivo da fração na dose de 500mg/Kg que foi observado nos ratos diabéticos nos tempos de 120 e 180 minutos. Como esse fármaco atua como antagonista inespecífico dos receptores opióides (MARTIN et al.,1976) pode-se concluir que esta via é responsável (pelo menos em parte) pela ação antinociceptiva da fração acetato de etila das cascas de *Cenostigma macrophyllum*.

Vale destacar que ao contrário do grupo diabético tratado com morfina que mostrou limiar estatisticamente superior ao do grupo diabético -Fração 500 + naloxona nos três tempos do pós-tratamento (60,120 e180 minutos), o grupo diabético-Fração 500 só foi superior ao diabético-Fração 500 + naloxona no último tempo (180 min). É provável, portanto, que pelo menos no tempo de 120 minutos a ação anti-nociceptiva da fração envolva outros mecanismos além do opióide. Outros mecanismos devem ser estudados, tais como, o serotoninérgico, o glutamatérgico e a via do óxido nítrico (NO).

4- Conclusão

A fração acetato de etila das cascas de *Cenostigma macrophyllum* mostrou ação antinociceptiva nas doses de 250 e 500mg/kg no modelo de neuropatia diabética periférica. A maior dose é também mais eficaz e essa ação envolve a participação de mecanismo opióide.

5- Apoio CNPq/CAPES/UFPI.

6- Referências bibliográficas

- CARVALHO, F. C. B. **Avaliação dos efeitos de *Cenostigma macrophyllum* na neuropatia diabética.** Teresina : EDUFPI, 2009. Dissertação defendida junto ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia (nível mestrado) da UFPI, 2009.
- CHAPLAN, S.R.; BACH, F.H.; POGREL, J.W.; CHUNG, J.M.; YAKSH, T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J. Neurosci. Methods**, Netherlands; v. 53, p. 55-63, 1994.
- CHEN, S.R., PAN, H.L. Hypersensitivity of spinothalamic tract neuroglitazone on diabetic neuropathy in streptozotocin-induced diabetics associated with diabetic neuropathic pain in rats. **Journal of neurophysiology**, United States; v. 87, p. 2726–2733, 1998.
- DOBRETSOV, M.; ROMANOVSKY, D.; STIMERS, J. R. Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms. **World Journal of Gastroenterology**, China; v. 13(2), p. 175-191, 2007.
- FREIRE, F. M. T. **Revisão taxonômica do gênero *Cenostigma* TUL. (Leguminosae - Caesalpinioideae) para o Brasil.** Recife: Editora da UFPE, 1994. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Pernambuco, 1994.
- MARTIN, W.R.; EADES, G. G.; THOMPSON, R.C.; HUPPLER, R.E.; GILBERT, P.E. The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, United States, v. 197, p. 517-532, 1976.
- PEPATO, M.T., FOLGADO, V.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**, Brazil; v. 34(3), p. 389-95, 2001.
- PEREIRA, S. S., ALMEIDA, F. R. C., CHAVES, M.H., SILVA, L. L., SILVA, A. M. O., ALENCAR, N. L. Estudo dos Efeitos antiinflamatório e analgésico da casca de *Cenostigma macrophyllum* TUL. var. acuminata Teles Freire. In: XIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPI, 2006, Teresina-PI. **Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da UFPI.** Teresina : EDUFPI, 2006.
- SBD-SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus-Diretrizes SBD.** São Paulo, 2006.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Química Nova**, Brasil, v. 30, p. 351-355, 2007.

Palavras chave: *Cenostigma macrophyllum*. Atividade antinociceptiva. Neuropatia diabética.