



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

INGRID PERPETUO SOCORRO PINHEIRO TODA

EFEITO DA CICLOBENZAPRINA EM RATOS DIABÉTICOS: INTERFERÊNCIA
GLICÊMICA, HEMATOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO

BELÉM-PARÁ-BRASIL

2016

INGRID PERPETUO SOCORRO PINHEIRO TODA

EFEITO DA CICLOBENZAPRINA EM RATOS DIABÉTICOS: INTERFERÊNCIA
GLICÊMICA, HEMATOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO

Defesa de artigo apresentado ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas Profissional.

Orientador: Prof. Dr^o Moisés Hamoy

Belém, 19 de agosto de 2016

INGRID PERPETUO SOCORRO PINHEIRO TODA

EFEITO DA CICLOBENZAPRINA EM RATOS DIABÉTICOS: INTERFERÊNCIA GLICÊMICA, HEMATOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO NO CÉREBRO.

Defesa de dissertação apresentada ao programa ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas Profissional.

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof^o Dr^o Moisés Hamoy
Instituto de Ciências Biológicas – (ICB -UFPA)

Membro: Prof^a Dr^a Vanessa Jóia de Mello
Instituto de Ciências Biológicas – (ICB -UFPA)

Membro: Prof^o Dr^o José Ricardo dos Santos Vieira
Instituto de Ciências Biológicas – (ICB -UFPA)

Membro: Prof^a Dr^a Maria Vivina Barros Monteiro- (UFPA)
Campus Castanhal – (UFPA)

Suplente: Prof^o Dr^o René Ribeiro da Silva- (ICB -UFPA)
Instituto de Ciências Biológicas – (ICB -UFPA)

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que
nos é dado.”

(Tolkien; J. R. R, 1892-1973)

DEDICATÓRIA

Para Ywa Toda, minha vida, minha inspiração.
“Para ver o mundo num grão de areia, e o céu em uma flor
selvagem, segure o infinito na palma da sua mão, e a
eternidade em uma hora.”
(Blake; William, 1757-1827)

AGRADECIMENTOS

À Ywa Toda, por todos os dias me ensinar algo novo.

Amada Mãe, obrigada.

Ao Prof. Dr^o. Moisés Hamoy, pela orientação, por todo apoio e incentivo dado para ultrapassar as barreiras encontradas na execução deste trabalho e mais ainda pela virtude da paciência.

À Prof. Dr.^a Maria Vivina Barros Monteiro pela oportunidade iniciada.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Federal do Pará – UFPA, e em especial à Keury.

Ao meu chefe e amigo George Francisco Souza Santos, por todas as vezes que me permitiu pausar o trabalho para me dedicar a este projeto.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Áurea Figueiredo, Dione Martins, Elaine Serrão, Khrisna Tabosa e tantos outros, por tolerarem minhas falhas, falta de tempo e ausências; acima de tudo pela compreensão, apoio e o incentivo - sem vocês não teria conseguido.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS	v
ARTIGO.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT:	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. METODOLOGIA.....	7
3. RESULTADOS	9
3.1 Níveis de Glicose Plasmática.....	9
3.2 Alterações Hematológicas	10
3.3 Estresse Oxidativo	11
4.0 DISCUSSÃO	11
5.0 CONCLUSÃO.....	13
6.0 TABELA E FIGURAS	15
7.0 REFERÊNCIAS.....	19

ARTIGO

- 1.1. Efeito da ciclobenzaprina em ratos diabéticos: interferência glicêmica, hematológica e estresse oxidativo no cérebro.

Autor1: Ingrid Perpetuo Socorro Pinheiro Toda

Universidade Federal do Pará – Instituto de Ciências Biológicas

End. eletrônico: ingrid.toda@gmail.com

End. postal: Av. Pedro Miranda, 1.666 B – Pedreira. CEP: 66085-023 – Belém – PA–Brasil.

Telefone: (91) 98259 1222

Autor 2: Moisés Hamoy

Universidade Federal do Pará - Instituto de Ciências Biológicas

End. eletrônico: hamoyufpa@gmail.com

End. postal: Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas. Rua Augusto

Correa, S/N, Guamá. CEP: 66075-110 - Belém, PA - Brasil

Telefone: (91) 3201 7545

Título abreviado para título de página: Efeitos da ciclobenzaprina em diabéticos

Palavras chave: Ciclobenzaprina, glicemia, diabetes, estresse oxidativo.

Número de palavras: 3.488

Tipo de Manuscrito: Artigo original submetido à revista “ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA”.

1 RESUMO

2

3 A diabetes é o resultado de uma deficiência, parcial ou total, de secreção de insulina pelas
4 células β -pancreáticas que resulta em hiperglicemia e distúrbios metabólicos. São propostos
5 vários modelos experimentais de diabetes, sendo a utilização do aloxano uma via amplamente
6 estudada e usada. O objetivo do trabalho foi verificar se no modelo experimental de diabetes
7 induzido por aloxano ocorre alteração no quadro glicêmico de animais tratados com a
8 ciclobenzaprina e ainda verificar se acontecem alterações hematológicas e nos marcadores de
9 estresse oxidativo no cérebro, visto que a ciclobenzaprina possui sugestivo mecanismo de ação
10 α_2 e este tipo de receptor também é expresso nas células β -pancretáticas e no *locus coeruleus*,
11 no cérebro. Metodologia: ratos Wistar normoglicêmicos e diabéticos induzidos por aloxano foram
12 tratados com ciclobenzaprina para avaliação da ação da droga após única dose e após tratamento
13 prolongado de 14 dias. Resultados: a utilização da ciclobenzaprina aumentou a glicemia nos
14 animais diabéticos sem afetar significativamente os animais saudáveis. A ciclobenzaprina agiu
15 como protetora dos danos oxidativos no cérebro dos animais do experimento. A utilização da
16 ciclobenzaprina precisa ser monitorada em pacientes diabéticos. Os efeitos nos perfis glicêmicos
17 e hematológicos destes pacientes devem ser considerados para uso do medicamento. Este
18 estudo fornece evidências para maiores explicações sobre o uso do medicamento em pacientes
19 diabéticos, assim como a necessidade de disponibilizar a informação para o público alvo.

20

21 ABSTRACT:

22

23 Diabetes is the result of a deficiency, partial or total, in the secretion of insulin by the
24 pancreatic β cells, which results in hyperglycemia and metabolic disorders. Various experimental
25 models of diabetes are proposed. The use of alloxan is a very utilized model. The proposition of
26 this work is to verify if in the experimental model of diabetes by alloxan there is a alteration in the
27 glycemic state of animals treated with cyclobenzaprine and also verify that happen hematological
28 changes and markers of oxidative stress in the brain, as cyclobenzaprine has suggestive

29 mechanism α_2 action and this type of receptor is also expressed in pancreatic β -cells and *locus*
30 *coeruleus* in the brain. Methodology: both healthy Wistar rats and diabetic ones induced by alloxan
31 were treated with cyclobenzaprine for drug action evaluation after a single dose and after a
32 prolonged treatment of 14 days. Results: the use of cyclobenzaprine increases blood glucose in
33 diabetic animals without significantly affecting the healthy animals, and the haematological values
34 presented expressive alterations. The cyclobenzaprine acted as a protection from oxidative
35 damage in the brains of the animals of the experiment. The use of cyclobenzaprine needs to be
36 monitored in diabetic patients. The Effects in these patients' glycemic and haematological profiles
37 must be considered for the use of this medication. This study provides evidence for further
38 explanations about the use of the drug in diabetic patients, as well as the need to provide the
39 information to the target audience.

40

41 1. INTRODUÇÃO

42

43 Diabetes é uma doença metabólica, onde a hiperglicemia é característica, resultado de
44 defeitos na produção de insulina, sua ação ou ambos (1). Essa hiperglicemia diabética prolongada
45 causa uma variedade de mudanças patológicas em pequenos vasos, artérias e nervos periféricos.
46 As células do endotélio vascular tornam-se alvos primários dos danos hiperglicêmicos por causa
47 do fluxo contínuo de glicose através deles (2).

48 Pela falta de oxigenação dos tecidos do corpo e lesões causadas pela grande quantidade
49 de glicose presente no sangue, pode haver dano aos olhos e nervos periféricos, perda de controle
50 da bexiga, danos renais, diminuição da sensibilidade das extremidades e gangrena; todos
51 resultados de diabetes cronicamente não tratada (2, 3, 4, 5 e 6).

52 Em função das comorbidades relacionadas ao diabetes, torna-se imprescindível a melhor
53 compreensão dos mecanismos fisiopatológicos do diabetes e de suas complicações (3). Para
54 tanto, modelos de indução experimental de diabetes são utilizados. O emprego do aloxano (3 e 7)
55 é uma via amplamente utilizada por ser um análogo tóxico da glicose, que preferencialmente se
56 acumula nas células β do pâncreas através da proteína de transporte GLUT2 (Glucose
57 transporter-2). Uma vez transportado para dentro das células, o aloxano gera espécies reativas de
58 oxigênio numa reação redox cíclica com seu produto de redução, o ácido dialúrico (8),
59 constituindo assim o mecanismo de destruição celular.

60 Inicialmente o aloxano estimula a secreção de insulina, resultando em uma hipoglicemia
61 leve e transitória. A seguir ocorre um decréscimo nos níveis de insulina que persiste pelas
62 próximas 4h, neste momento também começam as primeiras alterações nas células β -
63 pancreáticas. Entre as 4 e 8h subseqüentes principiam as rupturas das membranas celulares com
64 aumento da insulinemia; nesta fase a hipoglicemia é severa podendo levar a convulsões e óbito,
65 se não houver administração de glicose. Na sequência instala-se a hiperglicemia persistente. O
66 ápice desta fase ocorre 144h após administração do aloxano com perda da integridade das
67 células β -pancreáticas que leva a um aumento da presença de macrófagos no tecido pancreático
68 (7 e 8).

69 O mecanismo de geração de radicais livres ocorre normalmente nas mitocôndrias,
70 membranas celulares e citoplasma; e constituem processos contínuos e fisiológicos para a
71 produção de energia (adenosina trifosfato) e várias reações bioquímicas, entretanto a produção
72 excessiva pode levar a danos oxidativos (9). Em pacientes diabéticos, estudos têm sugerido que o
73 estresse oxidativo surge apenas na doença avançada, sendo a sinalização pela insulina uma
74 parte fundamental para a regulação do metabolismo da glicose (6). A toxicidade da glicose nos
75 neurônios advém do aumento da oxidação da glicose. Na hiperglicemia prolongada, a cadeia
76 respiratória mitocondrial é prejudicada induzindo aos danos através da produção de espécies
77 reativas de oxigênio e nitrogênio (10).

78 Em cérebros sob estresse oxidativo, o ferro pode ser liberado de proteínas de
79 armazenamento, como ferritina ou heme proteínas, e contribuir para a iniciação e propagação da
80 peroxidação lipídica, sendo particularmente vulnerável a esta (11).

81 Devido ao seu elevado consumo de oxigênio, alto teor de ferro e alto conteúdo lipídico o
82 cérebro é muito susceptível ao estresse oxidativo, principalmente lipídeos de cadeias poli-
83 insaturadas, que são extremamente suscetíveis à peroxidação lipídica (6).

84 O diabetes mellitus está ainda associado a várias condições musculoesqueléticas
85 correlacionadas com tempo de evolução e controle inadequado da doença, onde o tratamento
86 geralmente requer analgesia e o repouso é desejado (12). A fibromialgia, caracterizada por dor
87 musculoesquelética difusa, tem sido associada ao diabetes mellitus tipo 2 (13). Dentro da vertente
88 terapêutica o uso de relaxantes musculares como a ciclobenzaprina reduzem a dor e
89 frequentemente melhoram o estado funcional do paciente com fibromialgia (14).

90 Relaxante da musculatura esquelética de ação central, a ciclobenzaprina, exerce efeito no
91 cérebro e na medula espinhal, deprimindo seletivamente a parte do sistema nervoso central que
92 controla o tônus muscular, promovendo relaxamento muscular durante o mal estar produzido por
93 espasmos musculoesqueléticos (15).

94 Resultados sobre o mecanismo de ação do medicamento induzem a idéia de que a
95 ciclobenzaprina aja como um agonista dos receptores adrenérgicos α_2 (16). Estudos mostram que
96 ciclobenzaprina diminui espontaneamente a taxa de excitação do locus coeruleus e assim reduz a
97 atividade espinhal dos neurônios motores α (17).

98 O relaxamento muscular, aparentemente, resulta de uma ativação de neurônios no *locus*
99 *coeruleus*, levando a um aumento da liberação de norepinefrina no corno anterior da medula e a
100 ação inibitória subsequente de norepinefrina em neurônios motores com receptores α_2
101 adrenérgicos (18), sendo predominantemente ao nível supra-espinhal reduzindo tanto a atividade
102 eferente dos receptores γ - e α - neuromotora. Esta ação não parece envolver mecanismos pré-
103 sinápticos (19 e 20). Os receptores α_2 também são expressos células β -pancreáticas, onde a
104 ativação inibe a liberação de insulina (21).

105 As frequências dos efeitos adversos com maior incidência relatada são: sonolência, boca
106 seca e vertigem; mais raramente (1%): taquicardia, arritmias, vasodilatação, palpitação e
107 hipotensão. Os efeitos antimuscarínicos periféricos podem inibir o fluxo salivar e favorecer
108 enfermidades bucais (22). Em pacientes idosos e com insuficiência hepática leve as
109 concentrações plasmáticas no estado estacionário são duas vezes maiores que em controles
110 saudáveis, devendo ser considerada uma redução de dose ou frequência da dosagem (23).

111 Não estão claramente discutidos na literatura dados sobre o uso da ciclobenzaprina por
112 diabéticos, ou sobre sua potencial interferência nos níveis de estresse oxidativo no cérebro, visto
113 que o suposto mecanismo de ação da droga, através dos receptores α_2 adrenérgicos, poderia
114 estar relacionado à fisiologia dos órgãos que expressam este tipo de receptor: pâncreas através
115 das células β e no cérebro pela ação no *locus coeruleus*.

116 O objetivo do trabalho foi verificar a atuação da ciclobenzaprina, em modelo de diabetes
117 induzido por aloxano, observando os perfis glicêmicos, hematológicos e alterações sobre o
118 estresse oxidativo no cérebro.

119 **2. METODOLOGIA**

120

121 O experimento foi conduzido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da
122 Universidade Federal do Pará, sob o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de
123 Uso de Animais de Experimentação (CEPAE-98/15); utilizando ratos machos Wistar (250-300g),
124 mantidos em ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura controlada ($22^\circ \pm 2^\circ\text{C}$), com água e
125 alimentação *ad libitum*, mantendo-se 3 animais por gaiola.

126 Após jejum sólido de 24h, o quadro de diabetes foi induzido por uma única injeção
127 intraperitoneal de aloxano, diluído em soro fisiológico momentos antes do uso, na dose de 60
128 mg/kg (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O monitoramento glicêmico dos animais foi feito após 24 h da
129 indução ao diabetes utilizando o glicosímetro OnCall® Plus. A administração de uma dose única
130 de dexametasona (0,6 mg/Kg), foi feita para que atuasse como hormônio contrarregulador (28),
131 protegendo parte das células β -pancreáticas, prevenindo a morte por hipoglicemia. Foram
132 considerados diabéticos os ratos que obtiveram glicemia superior a 140 mg/dL após 14 dias da
133 indução, indicando assim falha na produção de insulina, uma diminuição, ou ambos.

134 Os animais foram divididos em duas categorias: normoglicêmicos e diabéticos. Os ratos da
135 categoria normoglicêmica foram subdivididos em: controle normoglicêmico (grupo 1),
136 normoglicêmico sob estresse por 14 dias (grupo 2), normoglicêmico com dose única de
137 ciclobenzaprina (grupo 3) e normoglicêmico com tratamento de ciclobenzaprina durante 14 dias
138 (grupo 4). Enquanto os ratos da categoria diabética ficaram subdivididos em: diabético (grupo 5),
139 diabético sob estresse por 14 dias (grupo 6), diabético com dose única de ciclobenzaprina (grupo
140 7) e diabético com tratamento de ciclobenzaprina durante 14 dias, totalizando 8 grupos (n=9)
141 conforme Tabela 1. A dose de ciclobenzaprina administrada a cada animal do experimento foi de
142 3mg/Kg por via oral. Os grupos 1 e 5 sofreram mínima interferência (troca de cama, reposição de
143 água e ração). Os grupos 2 e 6 receberam por via oral solução fisiológica em volume equivalente
144 ao da administração da ciclobenzaprina de forma a simular o estresse de gavagem. Nos grupos 3
145 e 7 foi administrada pela via oral dose única de ciclobenzaprina, com esse parâmetro glicêmico
146 sendo avaliado após 12h e por fim, os grupos 4 e 8 receberam doses diárias orais de
147 ciclobenzaprina de 3mg/Kg durante 14 dias.

148 Após 24h da administração da última dose de tratamento do experimento amostras de
149 sangue foram coletadas em tubos de ensaio contendo EDTA 10%, pela punção da veia lateral da
150 cauda, mantidas sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Análises Clínicas do
151 ICB/UFGA – LAC. Para a avaliação dos parâmetros hematológicos foi utilizado o Contador
152 Hematológico BC 2800 VET, Mindray© e para a glicemia o glicosímetro OnCall® Plus.

153 Os animais foram submetidos à eutanásia conforme preceitos da legislação vigente (24),
154 para retirada dos cérebros e posterior avaliação do estresse oxidativo mensurado por meio dos
155 métodos para peroxidação lipídica e presença de nitritos (25, 26 e 11).

156 O processo de peroxidação lipídica libera principalmente malondialdeído (MDA), principal
157 marcador de extensão da peroxidação lipídica (25 e 26), assim esse parâmetro foi mensurado
158 seguindo metodologia de análise para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (11).

159 Os níveis de nitritos foram determinados segundo o Teste de Griess, que baseia a reação
160 na interação do nitrito com a sulfanilamida em meio ácido, onde ocorre uma reação de diazo
161 composto com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) que resulta na formação de um
162 composto intensamente avermelhado dentro do tempo de 10 minutos a 2 horas (27).

163 Os resultados estatísticos foram demonstrados pela média \pm desvio padrão, análise de
164 variância (ANOVA), seguida do pós-teste Tukey quando necessário, os valores de $p \leq 0,05$ foram
165 considerados estatisticamente significantes, utilizando o software *GraphPadPrism*® 5.

166 3. RESULTADOS

167 Os dados apresentados na Tabela 1 são relativos à distribuição dos grupos e à expressão
168 dos resultados do experimento.

169 3.1 Níveis de Glicose Plasmática

170 O quadro de diabetes induzido por aloxano foi bem sucedido. A glicemia do grupo
171 submetido à indução de diabetes com aloxano ($206,3 \pm 14,96$ mg/dL) foi estatisticamente maior que
172 a glicemia apresentada pelos animais normoglicêmicos ($87,67 \pm 5,244$ mg/dL) (Fig. 1A).

173 O grupo 6 ($244,8 \pm 30,16$ mg/dL), submetido ao estresse de gavagem, diferiu
174 estatisticamente dos grupos: 5 - diabético ($206 \pm 14,96$ mg/dL), 2 - normoglicêmico sob estresse por
175 14 dias ($96 \pm 4,5$ mg/dL) e 1 normoglicêmico ($87,67 \pm 5,244$ mg/dL) (Fig. 1B).

176 Após 14 dias de experimento a glicemia no grupo 1 ($87,67 \pm 5,244$ mg/dL), não apresentou
177 diferença estatística do grupo 2 ($96 \pm 4,5$ mg/dL). A administração de ciclobenzaprina não interferiu
178 no índice glicêmico da categoria normoglicêmica, nem sob tratamento com dose a única (grupo 3;
179 glicemia: $97 \pm 5,315$ mg/dL), nem sob o tratamento prolongado de 14 dias (grupo 4; glicemia:
180 $96,67 \pm 9,670$ mg/dL) (Fig. 2A).

181 No entanto, a interferência da ciclobenzaprina na glicemia da categoria diabética (figura
182 2B) é evidente quando comparados os valores glicêmicos entre os grupos 7, que recebeu apenas
183 uma dose de tratamento ($306,4 \pm 30,70$ mg/dL) e o grupo 5 ($206,3 \pm 14,96$ mg/dL), considerado
184 apenas diabético. Após 14 dias de administração de ciclobenzaprina no grupo 8 ($374,9 \pm$
185 $53,82$ mg/dL) os resultados mostram que a diferença estatística com o grupo 5 é mais acentuada.
186 Afirma-se, portanto que a ciclobenzaprina elevou glicemia de animais diabéticos neste estudo.

187

188 3.2 Alterações Hematológicas

189 Não foram evidenciadas alterações da ciclobenzaprina sobre a contagem no número de
190 eritrócitos entre os grupos 1 ($6,367 \pm 0,4704 \times 10^6$ mm³) e 4 ($5,981 \pm 0,4335 \times 10^6$ mm³); nem entre
191 os grupos 5 ($5,664 \pm 0,5404 \times 10^6$ mm⁶) e 8 ($5,667 \pm 0,5185 \times 10^3$ mm⁶) (Fig. 3A).

192 Entre os grupos 1 ($653,9 \pm 29,70 \times 10^3$ mm³), grupo 4 ($559,9 \pm 115,2 \times 10^3$ mm³), grupo 5
193 ($640,9 \pm 67,81 \times 10^3$ mm³) e grupo 8 ($573,3 \pm 70,04 \times 10^3$ mm³) a média de contagem no número de
194 plaquetas não evidenciou diferença significativa (Figura 3B).

195 A análise comparativa sobre o número de linfócitos circulantes demonstrou que existem
196 diferenças estatísticas quando são comparados os grupos 1 ($8,756 \pm 0,5548 \times 10^3$ mm³) e 5
197 ($6,189 \pm 1,154 \times 10^3$ mm³); grupos 1 e 4 ($4,367 \pm 1,065 \times 10^3$ mm³) e grupos 1 e 8 ($4,067 \pm 1,078 \times$
198 10^3 mm³) (Figura 4A).

199 Na análise de variância da contagem de monócitos observou-se que o grupo 1
200 ($1,889 \pm 0,3655 \times 10^3$ mm³) difere estatisticamente dos grupos 4 ($1,778 \pm 0,3193 \times 10^3$ mm³), 5
201 ($1,444 \pm 0,2404 \times 10^3$ mm³) e 8 ($0,9778 \pm 0,2333 \times 10^3$ mm³). Também há variação estatística
202 significativa quando considerando apenas os grupos 5 e 8 (Figura 4B).

203 Na contagem do número de granulócitos os testes estatísticos não revelaram diferenças
204 entre os grupos 1 ($1,189 \pm 0,3060 \times 10^3$ mm³) e 4 ($1,411 \pm 0,333 \times 10^3$ mm³), nem entre os grupos 1
205 e 5 ($1,189 \pm 0,2667 \times 10^3$ mm³); entretanto, o comparativo entre os grupos 5 e 8 ($0,7333 \pm 0,3279 \times$
206 10^3 mm³) mostrou que há diminuição significativa no número de monócitos do grupo diabético com
207 tratamento de ciclobenzaprina durante 14 dias (Figura 5).

208

209 3.3 Estresse Oxidativo

210 Não houve variação nos graus de peroxidação lipídica medidos dos cérebros dos animais
211 entre os grupos 1 ($0,3171 \pm 0,4645$ MDA em pmol/mg de proteína) e 5 ($0,340 \pm 0,597$ MDA em
212 pmol/mg de proteína); porém, com o tratamento de 14 dias com ciclobenzaprina os grupos 4
213 ($0,2457 \pm 0,03952$ MDA em pmol/mg de proteína) e 8 ($0,1971 \pm 0,01799$ MDA em pmol/mg de
214 proteína) mostraram redução dos níveis de MDA quando comparados aos seus respectivos
215 controles (grupos 1 e 5) (Figura 6A).

216 Quanto aos níveis de nitritos no cérebro dos animais, o grupo 1 ($3,081 \pm 1,024$ nitrito em
217 pmol/mg de proteína) apontou diferença estatística significativa quando comparado com grupos: 5
218 ($6,021 \pm 1,303$ nitrito em pmol/mg de proteína), 4 ($3,924 \pm 0,5072$ nitrito em pmol/mg de proteína) e 8
219 ($4,00 \pm 0,4708$ nitrito em pmol/mg de proteína). O variação entre os grupos 5 e 8 também foi
220 significativa (Figura 6B).

221 4.0 DISCUSSÃO

222

223 O diabetes experimental pode ser induzido por vários mecanismos, entre eles: estresse,
224 agentes químicos e pancreatectomia total ou parcial (3). Entretanto, todos possuem algum
225 inconveniente que ou podem ser muito onerosos ou não garantir a eficiência da indução do
226 quadro desejado, de forma que neste trabalho optou-se pela utilização de método químico de fácil
227 execução e que permitiu a utilização no número de animais desejados, destruindo parte da função
228 endócrina do pâncreas e mantendo a função exócrina.

229 No desenvolvimento do diabetes aloxânico, há destruição massiva das células β -
230 pancreáticas, com aumento da presença de macrófagos, e conseqüente hiperinsulinemia, como
231 resultado, os animais podem vir a óbito devido à coma hipoglicêmico (7 e 8).

232 A utilização da dose de 60 mg/Kg de aloxano garantiu a instalação do quadro de diabetes
233 nos animais inoculados com a caracterização clínica de diabetes e o desenvolvimento de
234 alterações clínicas (aumento da ingestão hídrica e diurese) e glicêmicas (média glicêmica de
235 $206,3 \pm 14,96$) nos animais inoculados. Para evitar a destruição total das células β -pancreáticas
236 foi realizada a administração de dexametasona (0,6 mg/Kg). A dexametasona agiu induzindo

237 resistência à insulina de maneira tempo-dependente e aumentando dos níveis plasmáticos de
238 glicose, proteínas totais, albumina, colesterol, glicogênio e gordura hepáticos (28); dessa forma foi
239 possível alcançar um quadro diabetogênico semelhante ao do diabetes tipo II.

240 Diabéticos em geral apresentam tendência à anemia (29, 30 e 31). Um dos fatores
241 associados à anemia na população diabética geralmente sem diagnóstico para fator de risco
242 vascular é a insuficiência renal (31). A incapacidade de produzir eritropoetina é um contribuinte
243 para a anemia em pacientes com diabetes mellitus. Esta parece ser uma manifestação da doença
244 renal diabética (30), resultante de um ou mais mecanismos, em geral associados à síndrome
245 nefropática ainda que em estágio inicial, envolvendo a deficiência de ferro ou ainda raramente
246 folato e vitamina B12 (29). Todavia, no diabetes aloxânico a diminuição no número de eritrócitos
247 parece ser devida à toxicidade do aloxano aos túbulos renais durante a excreção da droga (32).

248 A coleta e avaliação final dos dados deste estudo ocorreram no 29º dia após a indução do
249 quadro diabetogênico aloxânico, mostrando que há uma diminuição no número de linfócitos,
250 monócitos e granulócitos circulantes. Dados apontam que seguida à aplicação de aloxano a
251 contagem de leucócitos totais é reduzida após 24h, e estes valores retornam aos níveis basais
252 após 192h (7). Não parece à priori que estes dados estejam relacionados aos números diminuídos
253 do leucograma obtido no estudo, contudo o aloxano leva à atrofia do timo (32), glândula cuja
254 principal função é a produção de linfócitos, podendo ser este o fator intrínseco à diminuição da
255 contagem do número de linfócitos. Cita-se ainda a intensa migração de macrófagos, advindo da
256 diferenciação dos monócitos ocorrida durante a destruição das células β -pancreáticas na indução
257 do diabetes (7).

258 A hiperglicemia prolongada induz ao estresse oxidativo, de tal modo que a peroxidação
259 lipídica encontra-se aumentada (33 e 34). No experimento realizado apenas os animais diabéticos
260 tiveram elevação dos níveis de peroxidação.

261 Inicialmente acreditou-se que a ciclobenzaprina agiria como α_2 agonista diminuindo a
262 atividade dos neurônios noradrenérgicos descendentes. A droga reduz a amplitude do reflexo
263 monossináptico de forma dose dependente; esse efeito não é inibido pelos antagonistas α_2 -
264 adrenérgicos idazoxano e ioimbina (16). O sugestivo mecanismo de ação da ciclobenzaprina

265 sobre o *locus coeruleus*, diminuindo o metabolismo cerebral, poderia ser o fator de redução do
266 processo de peroxidação lipídica.

267 De forma similar os níveis de nitritos ficaram diminuídos nos animais sob utilização do
268 medicamento, isso confirma a diminuição do metabolismo cerebral e a ação defensora da
269 ciclobenzaprina contra o estresse oxidativo e do aumento dos níveis de nitritos no cérebro.

270 **5.0 CONCLUSÃO**

271

272 A utilização da ciclobenzaprina não interferiu na curva glicêmica dos animais
273 normoglicêmicos, mesmo após 14 dias de tratamento. Entretanto, nos animais induzidos ao
274 diabetes houve um aumento significativo da glicemia após administração em dose única do
275 medicamento, e aumento mais acentuado após 14 dias de tratamento. Este fato deve ser avaliado
276 antes do uso do medicamento, considerando um monitoramento na glicemia de pacientes
277 diabéticos.

278 A diminuição da contagem de linfócitos e monócitos poderia estar relacionada somente à
279 toxicidade do aloxano, entretanto, após 14 dias de tratamento com ciclobenzaprina ocorre uma
280 diminuição significativa destes parâmetros tanto na categoria diabética quanto na categoria
281 normoglicêmica, confirmando que o medicamento interfere no número circulante de células
282 dessas linhagens. A contagem de diminuída de granulócitos no grupo 8, também demonstra que a
283 ciclobenzaprina interfere nessa série.

284 A droga agiu como fator de proteção contra os danos oxidativos no cérebro dos ratos,
285 confirmando o sugestivo mecanismo de ação α_2 agonista. Provavelmente em função da
286 diminuição do metabolismo cerebral provocado pelo medicamento ocorreram as diminuições dos
287 níveis de nitritos e de peroxidação lipídica.

288 Não foram encontradas informações sobre a interação glicêmica na bula do medicamento
289 (apresentações genérica e medicamento de referencia), ou das alterações hematológicas
290 possíveis em pacientes diabéticos. Essas informações devem estar disponíveis para o público
291 alvo.

292 Este estudo oferece evidências para futuras e mais amplas explicações sobre os
293 mecanismos de ação da ciclobenzaprina, sua correlação com o paciente diabético e interações
294 com outros medicamentos que o paciente diabético normalmente utiliza.
295

6.0 TABELA E FIGURAS

	Grupos	Glicemia (mg/dL)	Eritrócitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Granulócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	Peroxidação lipídica MDA em pmol/mg de proteína	Nitrito Em pmol/mg de proteína	
1	Animais não diabéticos	Controle	87,67 \pm 5,244	6,367 \pm 0,4704	653,9 \pm 29,70	8,756 \pm 0,5548	1,889 \pm 0,3655	1,189 \pm 0,3060	0,3171 \pm 0,4645	3,081 \pm 1,024
		Normoglicêmico								
	Animais diabéticos	Diabético	206,3 \pm 14,96	5,664 \pm 0,5404	640,9 \pm 67,81	6,189 \pm 1,154	1,444 \pm 0,2404	1,189 \pm 0,2667	0,340 \pm 0,597	6,021 \pm 1,303
		Diabético sob estresse	244,8 \pm 30,16	-	-	-	-	-	-	-
2	Animais não diabéticos	Normoglicêmico sob estresse	96 \pm 4,5	-	-	-	-	-	-	-
		Normoglicêmico ciclobenzaprina dose única.	97 \pm 5,315	-	-	-	-	-	-	-
3	Animais não diabéticos	Normoglicêmico ciclobenzaprina durante 14 dias.	96,67 \pm 9,670	5,981 \pm 0,4335	559,9 \pm 115,2	4,367 \pm 1,065	1,778 \pm 0,3193	1,411 \pm 0,333	0,2457 \pm 0,03952	3,924 \pm 0,5072
		Diabético com ciclobenzaprina dose única.	306,4 \pm 30,70	-	-	-	-	-	-	-
4	Animais diabéticos	Diabético com ciclobenzaprina durante 14 dias.	374,9 \pm 53,82	5,667 \pm 0,5185	573,3 \pm 70,04	4,067 \pm 1,078	0,9778 \pm 0,2333	0,7333 \pm 0,3279	0,1971 \pm 0,01799	4,00 \pm 0,4708
		Diabético com ciclobenzaprina durante 14 dias.								

Tabela 1. Divisão dos Grupos, tipos de tratamentos dispensados e valores encontrados nos parâmetros analisados. (Os valores são médias \pm desvio padrão, variância entre os grupos (ANOVA), seguida do pós-teste Tukey, os valores de $p \leq 0,05$ =significantes).

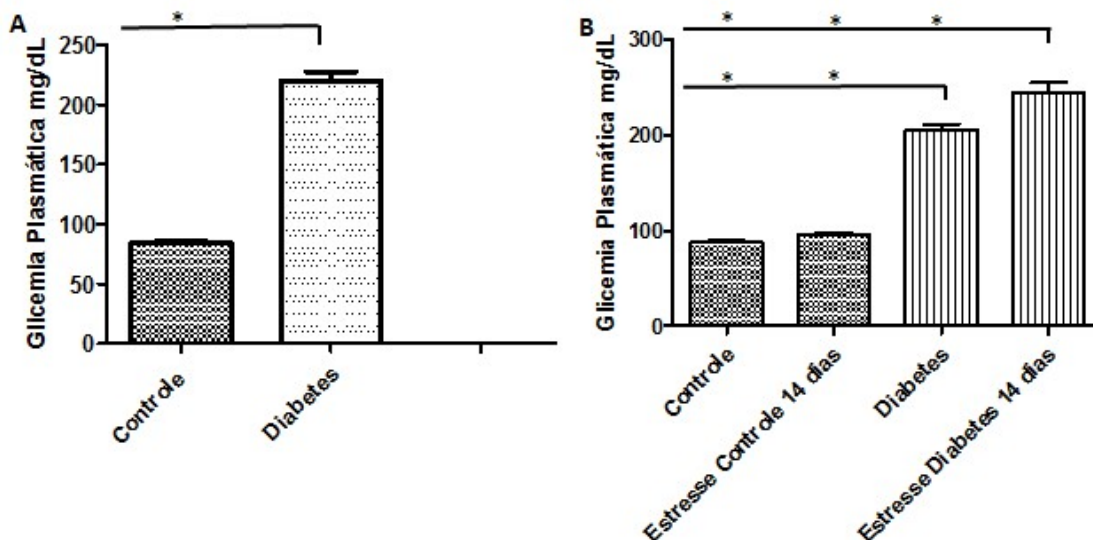


Figura 1. Glicose plasmática aferida 14 dias após a indução do diabetes com aloxano nos grupos 1 e 5 (1A). Níveis plasmáticos de glicose em animais dos grupos 1, 2, 5 e 6 mensurados após 14 dias de tratamento (1B) (média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

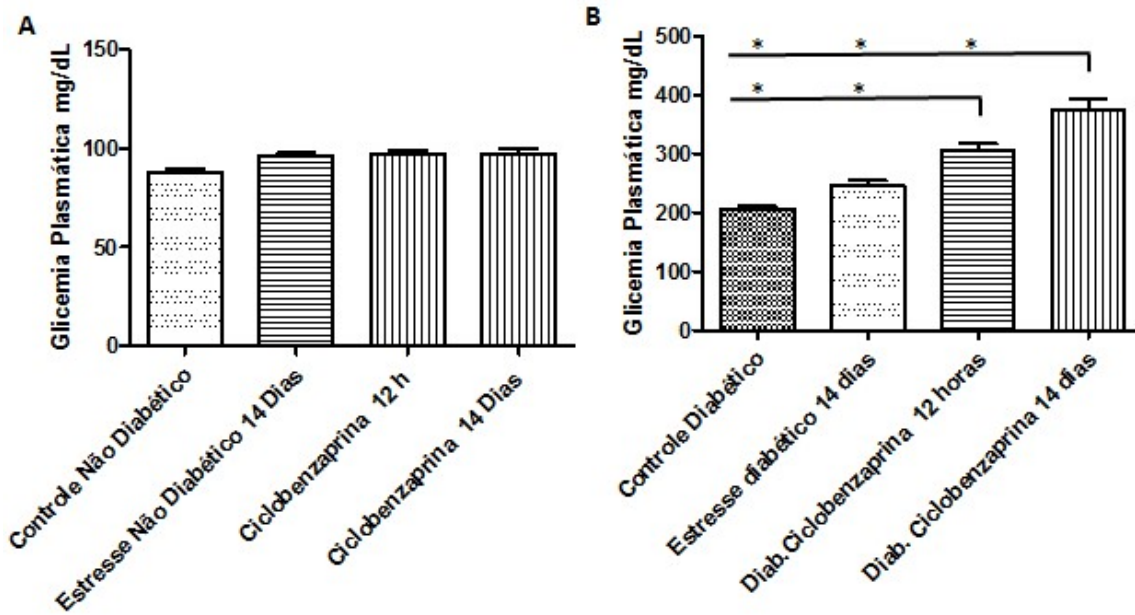


Figura 2. Interferência da ciclobenzaprina na glicemia plasmática dos grupos 1, 2, 3 e 4 (2 A). Interferência da ciclobenzaprina na glicemia plasmática dos grupos 5, 6, 7 e 8 (2 B) (média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

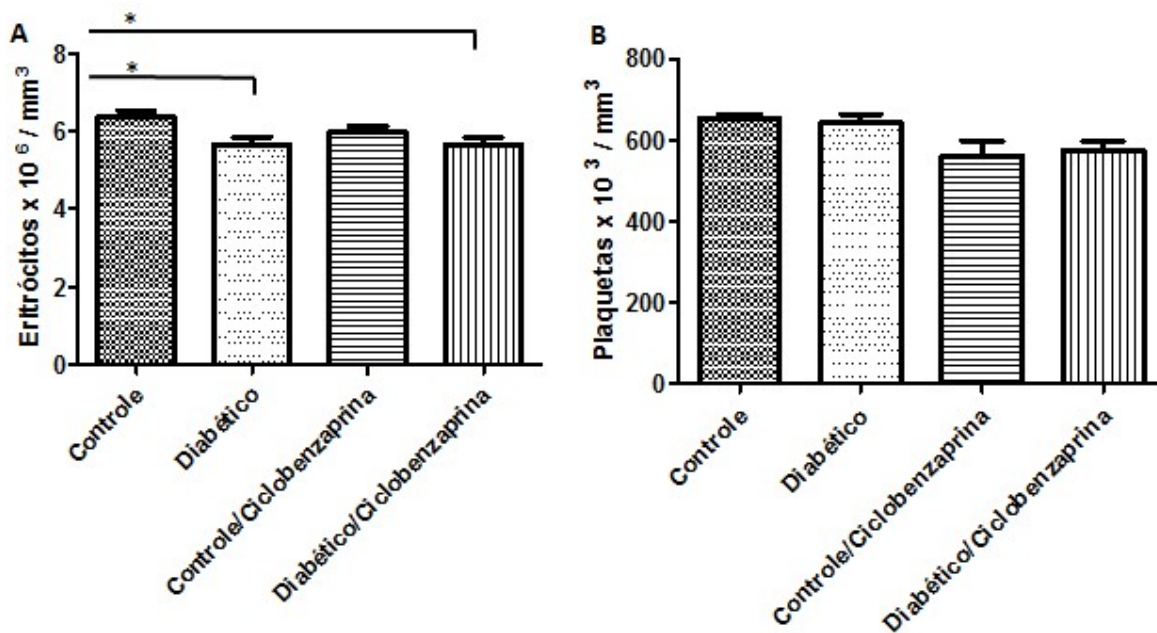


Figura 3. Variações no número de eritrócitos observados nos grupos 1, 5, 4 e 8 (3 A) durante 14 dias. Alterações na quantidade de plaquetas nos grupos 1, 5, 4 e 8 (3 B) (média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

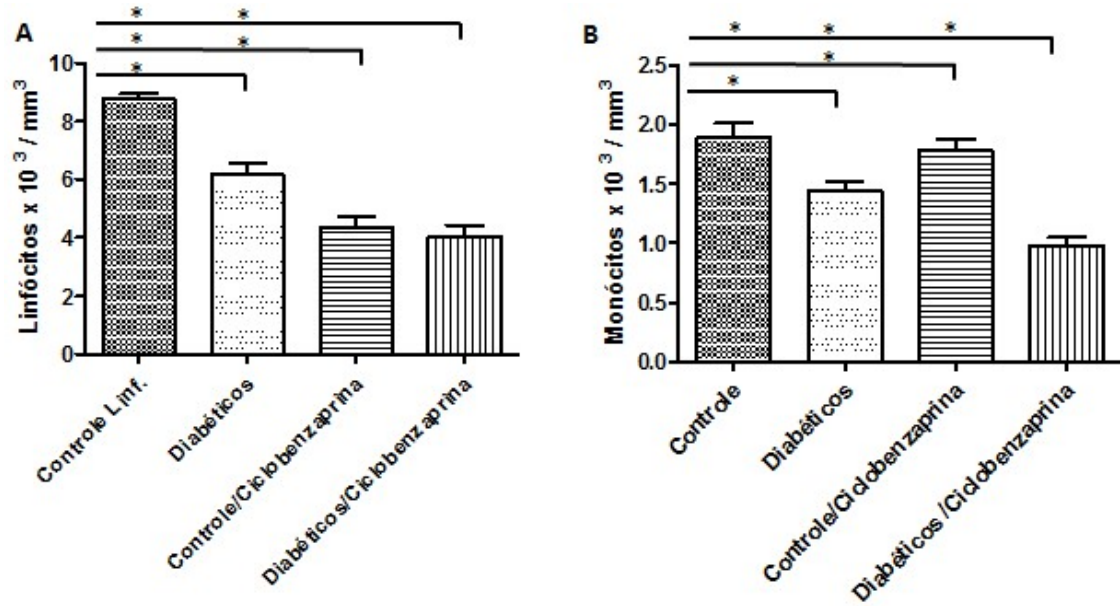


Figura 4. Variações no número de Linfócitos observadas nos grupos 1, 5, 4 e 8 (4 A). Alterações na quantidade de Monócitos grupos 1, 5, 4 e 8 (4 B) (média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

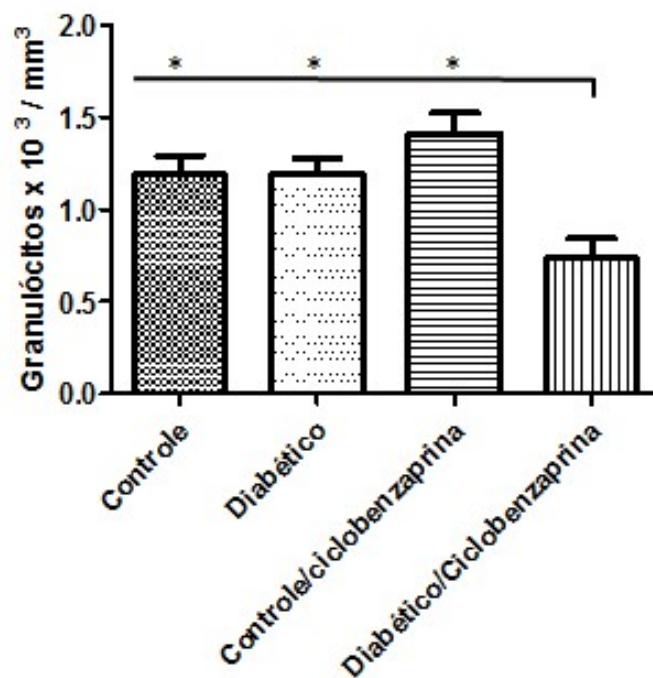


Figura 5. Variações no número de granulócitos observadas nos grupos 1, 5, 4 e 8(média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

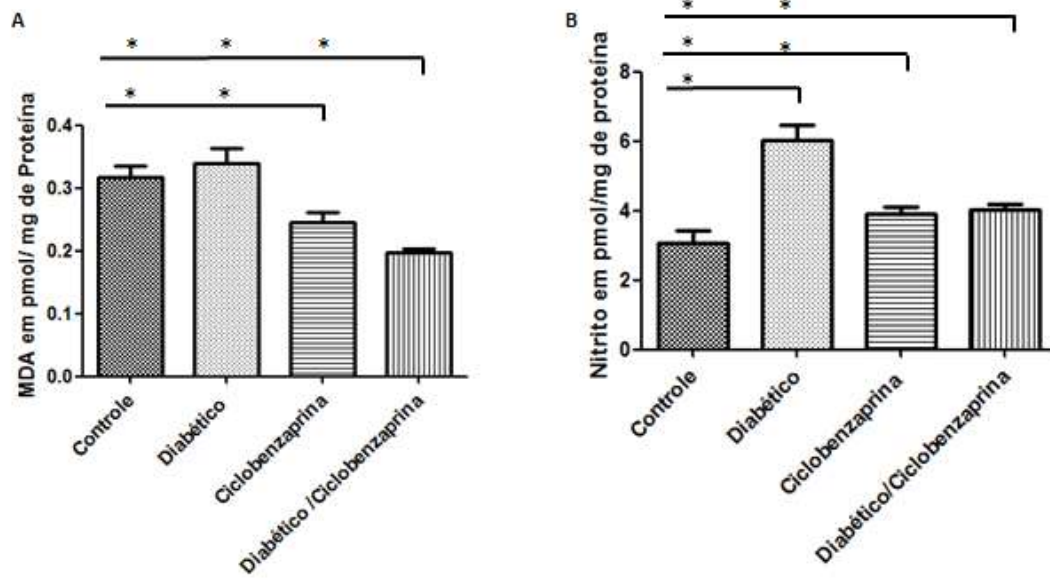


Figura 6. Níveis de peroxidação lipídica no cérebro dos grupos 1, 5, 4 e 8 (6 A), avaliação dos níveis de nitrito no cérebro dos grupos 1, 5, 4 e 8 (6 B) (média \pm desvio padrão, ANOVA e pós-teste Tukey, $p \leq 0,05$ =significativo).

7.0 REFERÊNCIAS

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 29, n. 1, p. S43, 2006.
2. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v. 29, n. 1, p. S43, 2006.
3. LERCO, Mauro Masson et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir Bras**, v. 18, n. 2, p. 132-42, 2003.
4. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da sociedade brasileira de diabetes**; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2015.
5. GUYTON, Arthur Clifton; HALL, John E.; GUYTON, Arthur C. **Tratado de fisiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006.
6. HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.
7. LEME, José Alexandre Curiacos de Almeida et al. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. **Biosci. j.(Online)**, v. 26, n. 3, p. 451-456, 2010.
8. LENZEN, Sigurd. The mechanisms of alloxan-and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008.
9. BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
10. MASTROCOLA, R. et al. Oxidative and nitrosative stress in brain mitochondria of diabetic rats. **Journal of Endocrinology**, v. 187, n. 1, p. 37-44, 2005.
11. ALVES, Clayton Queiroz et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. 2010.
12. SILVA, Marília Barreto Gameiro; SKARE, Thelma Larocca. Musculoskeletal disorders in diabetes mellitus. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 4, p. 601-609, 2012.
13. WOLAK, Talya et al. [Prevalence of fibromyalgia in type 2 diabetes mellitus]. **Harefuah**, v. 140, n. 11, p. 1006-9, 1120, 1119, 2001.
14. HEYMANN, Roberto Ezequiel et al. Consenso brasileiro do tratamento da fibromialgia. **Rev bras reumatol**, v. 50, n. 1, p. 56-66, 2010.
15. KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara**: 2004/2005. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
16. KOBAYASHI, Hiroyuki; HASEGAWA, Yutaka; ONO, Hideki. Cyclobenzaprine, a centrally acting muscle relaxant, acts on descending serotonergic systems. **European journal of pharmacology**, v. 311, n. 1, p. 29-35, 1996.
17. BARNES, C. D.; FUNG, S. J.; GINTAUTAS, J. Brainstem noradrenergic system depression by cyclobenzaprine. **Neuropharmacology**, v. 19, n. 2, p. 221-224, 1980.
18. COMMISSIONG, John W. et al. Cyclobenzaprine: a possible mechanism of action for its muscle relaxant effect. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 37-44, 1981.
19. SHARE, N. N. Cyclobenzaprine: effect on segmental monosynaptic and tonic vibration reflexes in the cat. **Neuropharmacology**, v. 17, n. 9, p. 721-727, 1978.
20. LACY, C. F. et al. Medicamentos Lexi-Comp Manole. São Paulo: Ed. brasileira. 2009.
21. GOLAN, David et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Guanabara Koogan, 2009.
22. CHOU, Roger; PETERSON, Kim; HELFAND, Mark. Comparative efficacy and safety of skeletal muscle relaxants for spasticity and musculoskeletal conditions: a systematic review. **Journal of pain and symptom management**, v. 28, n. 2, p. 140-175, 2004.
23. WINCHELL, Gregory A. et al. Cyclobenzaprine pharmacokinetics, including the effects of age, gender, and hepatic insufficiency. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 61-69, 2002.

24. CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências.** Resolução n. 1000, de 11 de maio de 2012. Disponível em:<<http://portal.cfmv.gov.br/portal/index.php>>. Acesso em: 14 mai. 2015.
25. BOTSOGLOU, Nickos A. et al. Rapid, sensitive, and specific thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food, and feedstuff samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 1931-1937, 1994.
26. OSAWA, Cibele Cristina; DE FELÍCIO, Pedro Eduardo; GONÇALVES, Lireny Ap Guaraldo. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655, 2005.
27. RAMOS, Luiz Antônio; CAVALHEIRO, Carla Cristina Schmitt; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114, 2006.
28. DE LELLIS SANTOS, Camilo; RAFACHO, Alex; BOSQUEIRO, José Roberto. Efeitos da administração de dexametasona in vivo sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007.
29. MEHDI, Uzma; TOTO, Robert D. Anemia, diabetes, and chronic kidney disease. **Diabetes care**, v. 32, n. 7, p. 1320-1326, 2009.
30. THOMAS, Merlin C. et al. Anemia with impaired erythropoietin response in diabetic patients. **Archives of internal medicine**, v. 165, n. 4, p. 466-469, 2005.
31. SUDCHADA, Patcharaporn; KUNMATUROS, Piwadee; DEOISARES, Rawisut. Prevalence of Anemia in Thai Type 2 Diabetic Patients with No Diagnosis of Associated Cardiovascular or Chronic Kidney Diseases. **Srinagarind Medical Journal (SMJ)-ศรินครินทร์ เวช สาร**, v. 28, n. 2, p. 190-198, 2013.
32. DORNAS, Waleska C. et al. **Aloxano e Diabetes.** Rev Bras Toxicol, v. 19, n. 2, p. 81-7, 2006.
33. KUMAR, JS Suresh; MENON, Venugopal P. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. **Metabolism**, v. 42, n. 11, p. 1435-1439, 1993.
34. CAPELLINI, Verena Kise et al. Oxidative stress is not associated with vascular dysfunction in a model of alloxan-induced diabetic rats. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 6, p. 530-539, 2010.