



Instituto de
Biociências



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Myrcia bella* Cambess. EM FÍGADO,
MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSO EM MODELO DE DIABETES
TIPO 1 POR ESTREPTOZOTOCINA

PRISCILLA MARIA PONCE VAREDA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção do título de Doutor no
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Biologia de Processos e
Sistemas

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2017



Instituto de
Biociências

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Myrcia bella* Cambess. EM FÍGADO,
MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSEO EM MODELO DE DIABETES
TIPO 1 POR ESTREPTOZOTOCINA

PRISCILLA MARIA PONCE VAREDA

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do
título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em
Biologia Geral e Aplicada, Biologia de Processos e
Sistemas

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vareda, Priscilla Maria Ponce.

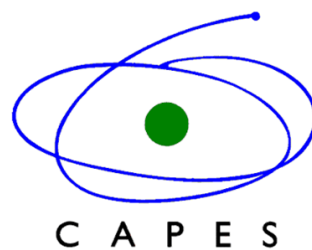
Investigação dos mecanismos de ação hipoglicemiante do extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* Cambess. em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em modelo de diabetes tipo 1 por estreptozotocina / Priscilla Maria Ponce Vareda. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: José Roberto Bosqueiro
Capes: 20702000

1. Diabetes mellitus. 2. Hipoglicemiantes. 3. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 5. Tecido adiposo. 6. Fígado. 7. Sistema musculoesquelético. 8. Estreptozocina.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; Fígado; Metabolismo de glicose; *Myrcia bella*; Tecido adiposo.

Auxílio Financeiro: FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo). Processo FAPESP nº 2012/23605-2 e CAPES (Comissão de aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) Processo nº 99999.003633/2015-02



Dedicatória

Dedico esse trabalho a Deus, que me deu capacidade e forças para cumprí-lo, e à minha família, em especial meus pais, José Carlos Vareda e Angela Tereza Ponce Vareda, pela confiança, dedicação, amor e apoio incondicionais.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente a Deus, que me capacitou, me deu sabedoria e inteligência para o cumprimento de mais um ciclo em minha vida.

Agradeço ao meu orientador, José Roberto Bosqueiro, pela oportunidade oferecida de realizar estágio em seu laboratório desde a graduação. Agradeço por acreditar em mim, na minha capacidade intelectual e de produção e na minha evolução científica. Obrigada Beto por todos esses anos de parceria, você abriu grandes portas em minha vida e serei sempre grata.

Agradeço à professora Anne Lígia Dokkedal, pelo fornecimento dos extratos durante todos esses anos e também pelos conselhos dados.

Agradeço ao professor Christian Wolfrum, por ter me recebido para a realização do doutorado sanduíche em seu laboratório, por acreditar cegamente no meu trabalho e por me fornecer todo o apoio para a realização do mesmo.

Agradeço à Sylvia Turner, secretária do professor Christian Wolfrum, que me acolheu, me acomodou e me ajudou em todos os detalhes da minha ida à Suíça.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Processo FAPESP nº2012/23605-2).

Agradeço à Comissão de aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior (Processo nº99999.003633/2015-02).

Agradeço à minha família por todo apoio e suporte para a realização e finalização deste trabalho. Aos meus pais, José Carlos Vareda e Angela Tereza Ponce Vareda, que desde o momento que ingressei na universidade confiaram plenamente em mim e me apoiaram em todas as minhas decisões. Obrigada pai e mãe, por me apoiarem em todos os

meus momentos, por estarem ao meu lado nas horas difíceis e de desânimo, por cada telefonema e cada palavra de suporte enquanto estive na Suíça e também por todos os momentos de alegria que passamos juntos. Sem vocês nada disso teria sido possível. Agradeço a Deus todos os dias pela família que Ele me proporcionou. Vocês são a minha vida.

Agradeço aos meus amigos de laboratório, Natália Moretti Violato, Levy Malmonge, Karina Senna e Luiz Leornado Saldanha. Natí, muito obrigada por todos esses anos de amizade e de suporte, em especial a este último ano em que vivemos nossos medos e inseguranças juntas. Sentirei muito a sua falta mais estarei aqui torcendo sempre pelo seu sucesso. Levys, obrigada pela parceria de sempre, pela amizade, pelas risadas, pelos momentos de descontração. Obrigada por todos os experimentos que me ajudou e pela amizade sem fim. Ká, muito obrigada por toda a ajuda nos experimentos e pela amizade. Léo, agradeço pela amizade desde a época de graduação, pelo fornecimento dos extratos, pelas nossas conversas, pelos momentos de descontração e café, por todos os congressos que fomos juntos e que nunca eram os mesmos se você não estivesse e, principalmente, por ter me aberto as portas para a realização do estágio na Suíça. Serei sempre grata por tudo o que você fez por mim.

Agradeço à minha prima, Olívia Ponce, que, mesmo longe, se fez e se faz presente todos os dias de minha vida. Obrigada prima por todo apoio que você me deu enquanto estive na Suíça, por todas as palavras e todas as conversas diárias que me faziam ter forças para seguir em frente.

Agradeço a todos os meus amigos que participaram de mais essa etapa da minha vida. Àqueles que estiveram presente nos momentos em que mais precisei de uma palavra amiga. Agradeço em especial à Mariana Borgo, seu filho Vítor Alfredo e sua família, que se tornaram a minha família em Bauru. Obrigada minha amiga por ser tão presente todos

os dias e por participar plenamente da minha vida, dos meus sonhos e das minhas inseguranças.

Agradeço as minhas amigas de faculdade, Helga, Paula, Laís e Natalia, que desde sempre acompanharam a minha caminhada na vida acadêmica.

Agradeço as minhas amigas são-carlenses, Anna Claudia, Viví, Ingrid, Flávia e todas os outros que participaram desse momento de minha vida.

Agradeço ao Gustavo, que esteve ao meu lado em todos os momentos bons e ruins dessa etapa e que continua me apoiando e acreditando nos meus sonhos.

Agradeço a todos os amigos que me acolheram no laboratório de biologia translacional do Instituto Federal de Zurich, na Suíça. Em especiais, às minhas amigas de sala, Viviane Anastácio, Hua Dong e Dianne Dapito, pela convivência e aprendizado diários. Agradeço em especial à Dianne, que se tornou a minha melhor amiga desde o primeiro dia, companheira, professora e amiga de compras e de idas ao lago. Agradeço também à Marcella Terra, que chegou aos dois últimos meses antes de acabar meu estágio, mais que fez toda a diferença. Má, muito obrigada por ter feito parte desse momento da minha vida.

Agradeço os funcionários da Seção de Pós-graduação da UNESP de Botucatu por toda ajuda e informações prestadas.

MUITO OBRIGADA!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

Lista de Abreviaturas

AC	Camundongos normoglicêmicos tratados com acarbose
ADA	Associação Americana de Diabetes
AKT	Serina treonina cinase
Akt1	Serina treonina cinase 1
ATP	adenosina Trifosfato
CTL EXT	Camundongos normoglicêmicos tratados com extrato bruto de <i>M. bella</i>
CTL SAL	Camundongos normoglicêmicos tratados com veiculo salina
cDNA	DNA complementar
DEPC	dicarbonato de dietila
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> gestacional
DNA	ácido desoxirribonucleico
GAD65	descarboxilase do ácido glutâmico
G6P	Glicose-6-fosfato
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
GLUT 2	Transportador de glicose do tipo 2
GLUT 4	Transportador de glicose do tipo 4
GSK-3	Glicogênio sintase cinase 3
GSK-3 β	Glicogênio sintase cinase 3 beta
Gys1	Glicogênio sintase 1
Gys2	Glicogênio sintase 2
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IAA	Anticorpos anti-insulina

ICA	Anticorpos anti-ilhota pancreática
IDF	International Diabetes Federation
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS 1	Substrato do receptor de insulina tipo 1
LADA	Diabetes latente autoimune do adulto
MB	Camundongos normoglicêmicos tratados com o extrato bruto de <i>M. bella</i>
mRNA	RNA mensageiro
NAD ⁺	nicotina adenina dinucleotídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
p-AKT	Serina treonina cinase fosforilada
PCR	Reação de cadeia da polimerase
Pck1	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1
PI3-K	Fosfatidilinositol 3-cinase
p-PI3-K	Fosfatidilinositol 3-cinase fosforilada
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
Pik3r1	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKB	Proteína cinase B
qRT-PCR	Reação de cadeia da polimerase quantitativo em tempo real
RNA	ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
SDS	dodecil Sulfato de Sódio
Slc2a4	Transportador de glicose da família 2 e membro 4
STZ	estreptozotocina
STZ EXT	Camundongos diabéticos tratados com extrato bruto de <i>Myrcia bella</i>
STZ SAL	Camundongos diabéticos tratados com veículo salina
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

Lista de Figuras

Figura 1 -	Sinalização de insulina em tecido muscular e adiposo.....	31
Figura 2 -	A regulação do metabolismo de glicose no fígado.....	34
Figura 3 -	Arbusto da espécie <i>Myrcia bella</i> no Jardim Botânico de Bauru, SP.....	41
Figura 4 -	Perfil químico do extrato de <i>Myrcia bella</i>	42
Figura 5 -	Efeitos da administração de <i>Myrcia bella</i> (300 ou 600 mg/kg) na glicemia de jejum de camundongos.....	43
Figura 6A -	Expressões proteica e de mRNA de glicogênio sintase em fígado de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	60
Figura 6B -	Expressão proteica e de mRNA de PEPCK em fígado de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).	61
Figura 6C -	Expressão proteica e de mRNA de glicose-6-fosfatase em fígado de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTLEXT e STZEXT).....	61
Figura 7A -	Expressão proteica e de mRNA de PI3-K em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	65
Figura 7B -	Expressão proteica e de mRNA de AKT em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).	66

Figura 7C -	Expressão proteica e de mRNA de GLUT 4 em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	67
Figura 7D -	Expressão proteica e de mRNA de GSK-3 β em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	68
Figura 7E -	Expressão proteica e de mRNA de glicogênio sintase em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	69
Figura 8A -	Expressão da proteína PI3-K em tecido adiposo retroperitoneal de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	71
Figura 8B -	Expressão da proteína AKT em tecido adiposo retroperitoneal de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	71
Figura 8C -	Expressão da proteína GLUT 4 em tecido adiposo retroperitoneal de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	71
Fig. 9A-	Nível de insulina no pâncreas de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	73
Fig.9B-	Ilhotas coradas com insulina (x 400) no pâncreas de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e	

	STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT).....	74
Figura 10A-	Porcentagem de inibição da alfa glicosidase em diferentes concentrações do extrato bruto de <i>Myrcia bella</i>	75
Figura 10B-	Porcentagem de inibição da alfa amilase em diferentes concentrações do extrato bruto de <i>Myrcia bella</i>	75
Figura 11A-	Glicemia de camundongos normoglicêmicos tratados com salina (CTLSAL), extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> (MB) 600 mg/kg ou acarbose (controle positivo) (AC) 10 mg/kg após ingestão oral maltose na dose de 2 g/kg e área sob a curva.....	77
Figura 11B-	Glicemia de camundongos normoglicêmicos tratados com salina (CTLSAL), extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> (MB) 600 mg/kg ou acarbose (controle positivo) (AC) 10 mg/kg após ingestão oral de amido na dose de 2 g/kg e área sob a curva.....	77

Lista de tabelas

Tabela 1 –	Classificação etiológica do DM.....	27
Tabela 2 -	Classificação dos níveis de insulina em lâmina de pâncreas de camundongos.....	73
Tabela 3 -	Valores de IC ₅₀ para as enzimas alfa glicosidase a alfa amilase na presença do extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> e acarbose.....	75

Resumo

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada por hiperglicemia decorrente de defeitos na secreção ou ação da insulina, que acarreta distúrbios no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. A incidência do DM aumenta de maneira alarmante em todo o mundo e os estudos com plantas que possuam efeitos antidiabéticos despertam cada vez mais o interesse por parte de pesquisadores. Em resultados anteriores, observamos que camundongos induzidos por estreptozotocina exibiram melhora no quadro diabético após serem submetidos ao tratamento com extrato bruto das folhas de *Myrcia bella*. Neste trabalho, decidimos avaliar os mecanismos moleculares envolvidos nos processos de captação e armazenamento de glicose em tecidos periféricos como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo neste modelo experimental. No mais, procuramos avaliar a atividade inibitória *in vitro* e *in vivo* do extrato de *M. bella* sobre as enzimas alfa glicosidase e alfa amilase, bem como o conteúdo de insulina no pâncreas. Camundongos diabéticos (STZ SAL e STZ EXT) e controles normoglicêmicos (CTL SAL e CTL EXT) foram tratados durante 21 dias com salina ou extrato bruto de *M. bella* na dose de 600 mg/kg. Foram coletados porções de fígado para avaliação da expressão de genes e proteínas envolvidos nos processos de glicogênese, glicogenólise e neoglicogênese. Ainda, amostras de músculo gastrocnêmio foram obtidas para avaliação de genes e proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina e captação de glicose. Da mesma forma, a expressão das principais proteínas envolvidas na sinalização de insulina em tecido adiposo branco retroperitoneal também foi observada. O pâncreas foi coletado para avaliação do conteúdo de insulina. O tratamento com extrato bruto parece modular os processos de estoque e liberação de glicose no fígado de camundongos diabéticos (STZ EXT) através do aumento na

expressão das proteínas glicogênio sintase e diminuição da expressão de PEPCK e glicose -6-fosfatase e dos respectivos genes responsáveis pela tradução das duas últimas. O tratamento com extrato de *M. bella* também promoveu aumento da expressão da proteína GLUT4 em tecido adiposo retroperitoneal de camundongos diabéticos (STZ EXT). Os ensaios *in vitro* e *in vivo* mostraram que o extrato é eficiente tanto na inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase assim como na diminuição da glicemia pós prandial, após ingestão de amido e maltose. Através dos resultados obtidos pudemos concluir, pelo menos em parte, que o extrato age na redução da glicemia de camundongos diabéticos através da modulação dos processos que regulam a captação, estoque e liberação de glicose pelo fígado. Ainda, sua ação também pode ser associada em parte pela captação de glicose pelo tecido adiposo, assim como pela inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase intestinais.

Palavras chave: *Diabetes mellitus*, metabolismo de glicose, *Myrcia bella*, fígado, tecido adiposo

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion or action, which results in carbohydrates, proteins and lipids metabolism disturbances. DM incidence increases alarmingly worldwide and studies with plants, which exhibit anti-diabetic effects, arouse researcher's interests. In previous results we observed that streptozotocin-induced diabetic mice showed an improvement in diabetic condition after the treatment with *Myrcia bella* leaves crude extract. In this work, we have decided to evaluate the molecular mechanisms involved in glucose uptake and storage process in peripheral tissues such as liver, gastrocnemius muscle and adipose tissue. Furthermore, to evaluate the extract *in vivo* and *in vitro* inhibitory activity of alpha glycosidase and alpha amylase enzymes and insulin content in pancreas. Diabetic mice (STZ SAL and STZ EXT) and normoglycemic control mice (CTL SAL and CTL EXT) were treated during 21 days with saline or *M. bella* crude extract at 600 mg/kg. Liver was collected to gene and protein expression involved in glycogenesis, glycogenolysis and gluconeogenesis process. Gastrocnemius muscle to gene and protein expression involved in insulin signaling pathway and glucose uptake and white adipose tissue to the expression of the mainly proteins involved in insulin signaling pathway. Pancreas was collected to evaluate the insulin content. The treatment with *M. bella* crude extract seems to modulate the process of glucose storage and release in liver of diabetic mice (STZ EXT) through the increase of glycogen synthase expression and decrease of the of PEPCK and glucose – 6- phosphatase expression as well as the respectively genes involved in the translation of PEPCK and glucose – 6-phosphatase . The treatment with *M. bella* extract also increased the GLUT4 protein expression in adipose tissue of diabetic mice (STZ EXT). The *in vitro* and *in vivo* analysis showed the extract is efficient in alpha glycosidase and amylase enzymes

inhibition as well as in decreasing the postprandial glycemia after starch and maltose ingestion. Finally, we conclude that, at least in part, the extract acts in glycemia reduction through modulation of processes that regulates glucose uptake, storage and release from liver. Moreover, the extract action may be associated with the glucose uptake in adipose tissue as well as through the inhibition of alpha glycosidase and alpha amylase enzymes.

Keywords: adipose tissue, *Diabetes mellitus*, glucose metabolism, liver, *Myrcia bella*.

Sumário

1. Introdução.....	25
1.1 <i>Diabetes mellitus</i> e etiologia.....	26
1.2 Sinalização insulínica e metabolismo de glicose.....	30
1.3 Tratamentos usuais para o <i>Diabetes mellitus</i> e o uso de plantas medicinais.....	36
1.4 Família Myrtaceae, gênero <i>Myrcia</i> e espécie <i>Myrcia bella</i>	38
2. Objetivos.....	45
2.1 Objetivo Geral.....	46
2.1 Objetivos Específicos.....	46
3. Materiais e Métodos.....	47
3.1 Obtenção do extrato e análises farmacognósticas e químicas.....	48
3.2 Animais experimentais.....	48
3.3 Indução do diabetes experimental.....	49
3.4 Tratamento com extrato bruto de <i>Myrcia bella</i>	49
3.5 Extração proteica e Western Blot.....	49
3.6 Extração de RNA.....	51
3.7 Transcrição Reversa e síntese de cDNA.....	52
3.8 PCR em tempo real.....	52
3.9 Análises histológicas.....	53
3.9.1 Processamento tecidual.....	53
3.9.2 Imunohistoquímica para detecção de insulina em pâncreas.....	54

3.10 Ensaio enzimático <i>in vitro</i> para inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase e determinação de IC_{50}	54
3.10.1 Ensaio da atividade enzimáticas das glicosidases.....	55
3.10.2 Determinação do IC_{50}	55
3.11 Ensaio <i>in vivo</i> para inibição das enzimas alfa amilase e alfa glicosidase....	56
3.12 Análises Estatísticas.....	56
4. Resultados.....	57
4.1 Análise das expressões de mRNA e das proteínas glicogênio sintase (Gys2) PEPCCK (Pck1) e glicose-6- fosfatase (G6Pc) em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.....	58
4.2 Análise da expressão de mRNA e das proteínas PI3-K (Pik3r1) , AKT (AKt1) , GLUT4 (Slc2a4) GSK-3 β (GSK3b) e glicogênio sintase (Gys1) em músculo gastrocnêmio de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.....	62
4.3 Análise da expressão das proteínas AKT, PI3-K e GLUT4 nas formas total e fosforilada em gordura retroperitoneal de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.....	69
4.4 Análises imunohistoquímicas semi-quantitativas para detecção de insulina em pâncreas de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.....	72
4.5 Ensaio enzimático <i>in vitro</i> para inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase e determinação de IC_{50}	74
4.6 Avaliação <i>in vivo</i> da inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase.....	76
5. Discussão.....	79
6. Conclusão.....	96
7. Referências.....	98

8. Anexos.....	106
8.1 Certificado do comitê de ética para aprovação do projeto de pesquisa.....	107
8.2 Paper submetido no ano de 2014 referente aos resultados obtidos durante o mestrado da aluna.....	108

1. Introdução

1.1. *Diabetes mellitus* e etiologia

O termo *Diabetes mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica que acarreta alterações do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, resultante de defeitos na ação ou secreção da insulina, ou ambos (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2011). O diabetes afeta atualmente cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo e, estima-se que esse número atinja 642 milhões de pessoas diabéticas no ano de 2035 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). No Brasil, estima-se que haja cerca de 14,3 milhões de pessoas diabéticas. De modo geral, o diabetes é responsável por milhares de mortes por ano em todo mundo, associadas principalmente às suas complicações. Geralmente, as complicações ocorrem quando a doença é tardiamente diagnosticada ou quando não há controle dos níveis glicêmicos dos pacientes. As principais complicações associadas ao diabetes incluem hipertensão, hipertrigliceridemia (aumento sérico de triglicerídeos), hipercolesterolemia (aumento sérico de colesterol), problemas cardíacos, derrames, problemas oculares, nefropatia (podendo evoluir para insuficiência renal) e neuropatias (podendo evoluir de úlceras nos pés a amputações) que diminuem a qualidade de vida do paciente podendo, em casos mais graves, levar até a morte (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

A classificação do diabetes é definida a partir da etiologia da doença. A mesma, proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de diabetes (ADA), inclui quatro classes clínicas de DM: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (DMG) (Tabela 1). Há ainda duas categorias que se referem à tolerância a glicose diminuída e a alterações nos níveis de glicemia de jejum, porém tais categorias são consideradas fatores de risco para

desenvolvimento do DM e de doenças cardiovasculares, não sendo classificadas como classes clínicas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Tabela 1 - Classificação etiológica do DM (adaptado de MARASCHIN et al., 2010)

Classificação etiológica do DM

<u>1. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1</u>
A. Mediado imunologicamente
B. Idiopático
LADA
<u>2. <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2</u>
<u>3. Outros tipos específicos de diabetes</u>
Defeitos genéticos na função da célula beta
Defeitos genéticos na ação da insulina
Doenças do pâncreas exócrino (pancreatites)
Endocrinopatia
DM induzida por drogas (glicocorticoides)
DM induzida por infecções (citomegalovírus, rubéola)
Formas imunológicas incomuns (anticorpo contra receptor de insulina)
Outras síndromes genéticas (síndrome de Down, síndrome de Turner)
<u>4. <i>Diabetes mellitus</i> gestacional</u>

O DM1 é a segunda doença crônica mais frequente da infância e sua incidência vem aumentando nas últimas décadas. Dados epidemiológicos publicados no Atlas de Diabetes (2013), da International Diabetes Federation (IDF), estimam uma prevalência de cerca de 500 mil crianças menores de 15 anos com DM1 no mundo. Dentre os países com maior número de novos casos por ano estão os EUA, com 13 mil casos ao ano,

Índia, com cerca de 10.900 e o Brasil com 5 mil novos casos ao ano (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). O DM1 é responsável por cerca de 5% a 10% de todos os casos de diabetes, sendo dividido em três tipos: tipo 1A, 1B e diabetes autoimune latente do adulto (LADA). No DM1, de um modo geral, existe uma destruição das células β pancreáticas e seu tratamento exige o uso de insulina exógena para a sustentação da vida do paciente. No DM 1A, a destruição das células β é de etiologia autoimune (MARASCHIN et al., 2010). A maioria dos pacientes com esse tipo de diabetes desenvolvem anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A. Já no DM 1B, os pacientes não apresentam causas conhecidas sendo, portanto, classificado como idiopático (ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES, 2011). O DM tipo LADA é um DM do tipo 1 onde ocorre uma destruição autoimune das células β . No entanto, a progressão da doença é mais lenta e acomete indivíduos acima de 30 anos. O fenótipo dos pacientes é peculiar uma vez que os mesmos não são obesos e apresentam diagnóstico de DM numa idade compatível com diagnóstico de DM2. Além do mais, os pacientes com DM do tipo LADA têm sua doença inicialmente controlada por drogas orais. No entanto, ao longo do tempo apresentam sinais de progressiva perda de função da célula β e eventualmente necessitam do uso da insulina exógena (MARASCHIN et al., 2010). A deficiência na produção de insulina decorrente desse tipo de diabetes acarretará em distúrbios no metabolismo glicêmico e lipídico em decorrência do aumento nos processos de lipólise, proteólise, gliconeogênese e glicogenólise que são inibidos pela ação da insulina nos tecidos periféricos. Desse modo, além da glicose em excesso na circulação sanguínea, haverá maior produção e liberação de glicose pelo fígado, quebra e liberação de aminoácidos provenientes do tecido muscular além de

quebra e liberação de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo que, juntamente com os aminoácidos, servirão de substrato para uma maior produção e consequente liberação de glicose pelo fígado (CARVALHEIRA, ZECCHIN, SAAD, 2002).

O DM2 deve-se à deficiência relativa na produção pancreática de insulina associada à redução da sensibilidade dos tecidos à mesma, também conhecida como resistência periférica à insulina. Basicamente, o DM2 caracteriza-se por dois defeitos fisiopatológicos principais: a resistência à insulina, que resulta em aumento da produção hepática de glicose e redução da sua utilização periférica, e o comprometimento da função secretora das células β (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). A resistência insulínica ocorre quando uma concentração normal desse hormônio produz uma resposta biológica diminuída nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo e muscular. Essa resistência periférica ocorre por vários fatores e, dentre eles, pode-se destacar defeitos na ação da insulina em função do número menor de receptores ou menor afinidade destes pela insulina, redução na quantidade de proteínas transportadoras de glicose ou na translocação destas do citoplasma para a membrana. A transição da resistência insulínica para o diabetes é determinada principalmente pela incapacidade do pâncreas em aumentar a secreção da insulina adequadamente em resposta à hiperglicemia devido à exaustão e morte das células β (MCLELLAN et al., 2007).

Os outros tipos específicos de DM correspondem a formas menos comuns da doença na população e estão inclusos nessa categoria, defeitos genéticos na função das células beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, entre outras (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009) (Tabela 1).

O DMG é definido como uma tolerância diminuída à glicose, de graus variados de intensidade, que tem início ou é diagnosticada pela primeira vez durante a gravidez

(SENAT e DERUELLE, 2016). O DMG é o problema metabólico mais comum encontrado durante a gestação e sua prevalência varia de 3 a 25% entre as gestantes. A sua incidência tem aumentando de maneira preocupante em paralelo com o aumento do DM2 e da obesidade feminina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do diabetes gestacional incluem a idade avançada da mulher, ganho excessivo de peso na gravidez e deposição central excessiva de gordura corporal, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez, além de antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal e de histórico de diabetes na família (LIN et al., 2016).

1.2. Sinalização da insulina e metabolismo de glicose

As células do organismo necessitam continuamente de energia para realizarem as inúmeras reações metabólicas inerentes à atividade de cada tipo celular. O ciclo metabólico se inicia com a ingestão e absorção dos nutrientes da dieta. A glicose proveniente da alimentação pode, entre outros destinos, ser armazenada sob diferentes formas em alguns tecidos como fígado, tecido adiposo e músculo esquelético. Tais efeitos são mediados pela ação da insulina em resposta ao aumento da glicose na corrente sanguínea. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana (IR), uma proteína heterotetramérica com atividade cinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina cinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade cinase levando a sua alteração conformacional e auto fosforilação, o que aumenta ainda mais a atividade cinase do receptor (CARVALHEIRA, ZECCHIN, SAAD, 2002). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos

proteicos em tirosina, os chamados substratos de receptor de insulina. Existem cerca de dez substratos do receptor de insulina identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (WHITE, 1998). Uma das principais moléculas ativadas pelas proteínas IRS é a PI3-k, importante na regulação da mitogênese, metabolismo de glicose, diferenciação celular e para o processo de translocação do GLUT4 através da ativação da proteína AKT. A família de proteínas AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), também chamadas de proteínas cinase B (PKB), é composta por proteínas cinase de serina/tirosina que desempenham importante papel na sinalização celular de mamíferos. A fosforilação da AKT, que ocorre através da fosforilação da proteína PI3-K, modula varias ações intracelulares da insulina, principalmente, o aumento do transporte de glicose através da estimulação de vesículas contendo o transportador GLUT4 do citoplasma para a membrana celular em músculo e tecido adiposo (BRYANT et al., 2002) (Fig. 1).

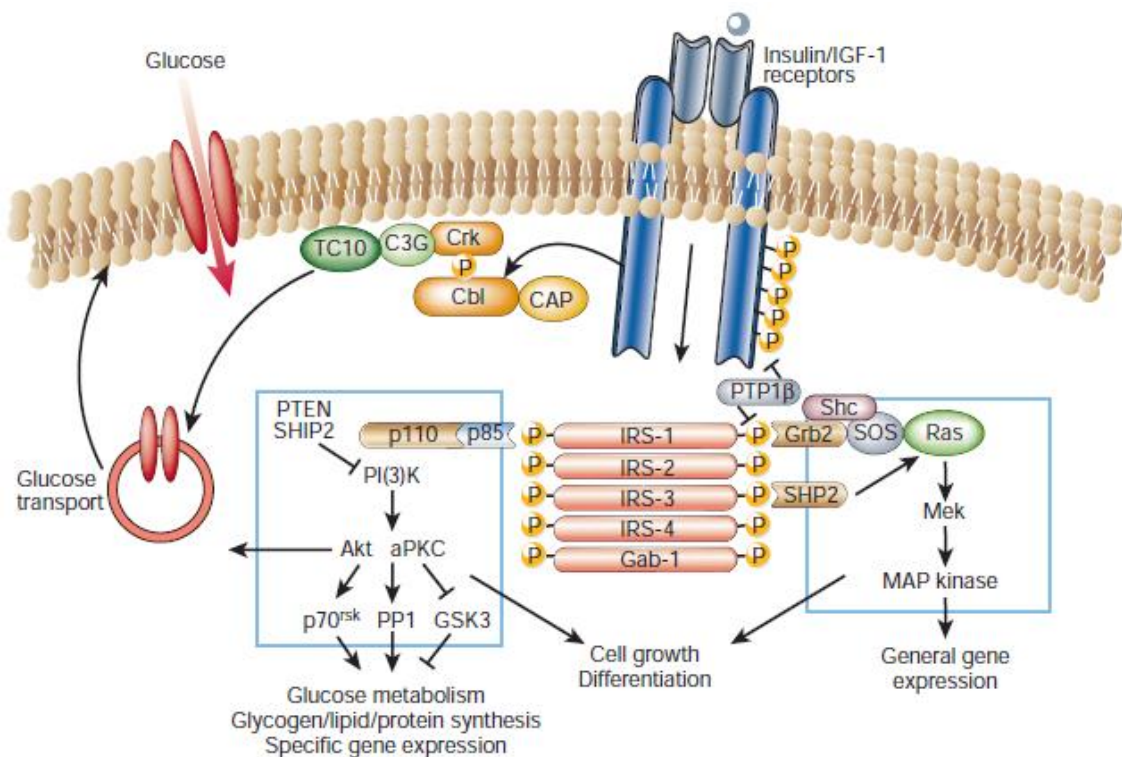


Figura 1 – Sinalização da insulina em tecido muscular e adiposo. O receptor de insulina é uma proteína tirosina cinase que sofre autofosforilação e catalisa a fosforilação de proteínas como as da família IRS, Shc e Cbl. Tais proteínas interagem com seus domínios SH2, resultando em uma cascata de sinalização, incluindo PI3-k, Map cinase e o complexo CAP/Cbl com ativação da proteína TC10. Essas vias agem coordenadamente no tráfego de vesículas, síntese proteica, ativação e inativação de enzimas e expressão gênica que resulta na regulação do metabolismo de glicose, proteínas e lipídeos (SALTIEL e KAHN, 2001).

O metabolismo hepático da glicose desempenha importante função na regulação do estoque energético, uma vez que o fígado é a principal fonte de estoque e liberação da mesma e também da síntese de ácidos graxos (VIOLLET et al., 2006). O alimento que ingerimos é digerido no trato gastrointestinal e, glicose, ácidos graxos e aminoácidos são absorvidos pela corrente sanguínea e transportados até o fígado pelo sistema porta hepático. No período pós prandial, a glicose é convertida em glicogênio, ácidos graxos ou aminoácidos no fígado. Os ácidos graxos livres são esterificados com glicerol-3- fosfato para gerar triacilglicerol, que pode ser estocado em gotas lipídicas nos hepatócitos ou então secretados na circulação como partículas de VLDL. Os aminoácidos são metabolizados para promover energia ou usados na síntese proteica, de glicose ou de outras moléculas bioativas. No jejum ou durante exercício físico, os substratos como glicose ou triglicérides são liberados do fígado para corrente sanguínea e metabolizados pelos músculos, tecido adiposo e outros tecidos extra-hepáticos. O tecido adiposo produz e libera ácidos graxos não esterificados e glicerol via lipólise. O músculo esquelético quebra glicogênio e proteínas e também libera lactato e alanina. Alanina, lactato e glicerol são recaptados pelo fígado e usados como precursores da síntese de glicose pela neoglicogênese. Os ácidos graxos não esterificados são então oxidados nas mitocôndrias dos hepatócitos através da beta oxidação para geração de energia celular (RUI, 2014).

A glicose entra nos hepatócitos via transportadores de glicose do tipo 2 (GLUT2), independente da ação da insulina, e é então fosforilada pela enzima glicoquinase (GCK) para geração de glicose -6- fosfato (G6P) (SEYER et al., 2013). Durante a respiração celular, a glicólise é a via pela qual a glicose é fosforilada formando piruvato/lactato e, ao final do processo, fornece substrato para a produção de energia pela formação de ATP, assim como substrato para os processos de glicogênese e lipogênese. O piruvato obtido ao final do processo da glicólise é então completamente oxidado para gerar ATP através do ciclo do ácido cítrico nas mitocôndrias, assim como pode também ser utilizado na síntese de ácidos graxos através da lipogênese. A glicose-6-fosfato pode ser também metabolizada pela via das pentoses-fostato para gerar NADPH, que é necessário para lipogênese e biossíntese de outras moléculas (RUI, 2014). O processo de glicogênese é mediado pela enzima glicogênio sintase para geração da glicose-6-fosfato. A insulina estimula a glicogênese pela ativação da enzima glicogênio sintase e/ou pela desfosforilação e inativação da enzima glicogênio fosforilase via AKT (NOGUSHI et al., 2013). Uma vez ativa, a enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK-3) inibe a expressão da enzima glicogênio sintase (WOODGETT e COHEN, 1984). Após estímulo com insulina, a AKT fosforila e inativa a GSK-3, o que diminui a taxa de fosforilação da glicogênio sintase aumentando, então, sua atividade (CROSS et al, 1995).

Durantes períodos curtos de jejum, o fígado libera glicose através do processo de glicogenólise. Durante jejuns prolongados, o glicogênio esgota-se e os hepatócitos sintetizam glicose através do processo de neoglicogênese utilizando lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos. Esses substratos neoglicogênicos são gerados diretamente no fígado ou então entregues ao fígado através da circulação sanguínea vindos dos tecidos extra-hepáticos. O lactato é oxidado pela enzima lactato desidrogenase para gerar

piruvato. Este é então transportado para as mitocôndrias e convertido em oxalacetato. O oxalacetato é reduzido à malato pela malato desidrogenase mitocondrial e exportado então para o citoplasma. Uma vez no citoplasma, o mesmo é oxidado e convertido novamente em oxalacetato. O oxalacetato citoplasmático é então convertido em fosfoenolpiruvato pela enzima PEPCK. Este, depois de múltiplas reações bioquímicas, é convertido em frutose 1,6-bifosfato e desfosforilado formando a frutose-6-fosfato. Esta finalmente é convertida em glicose-6 - fosfato que será liberada na circulação na forma de glicose após hidrólise (RUI, 2014) (Fig. 2). A insulina inibe diretamente a transcrição de genes que codificam PEPCK e também diminui a taxa de transcrição dos genes que codificam a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase, aumentando a transcrição de genes de enzimas glicolíticas como a glicoquinase e piruvato cinase, o que diminui a liberação de glicose para a circulação (PILKS e GRANER, 1992; SURTHERLAND, O'BRIEN, GRANNER, 1996) (Fig. 2).

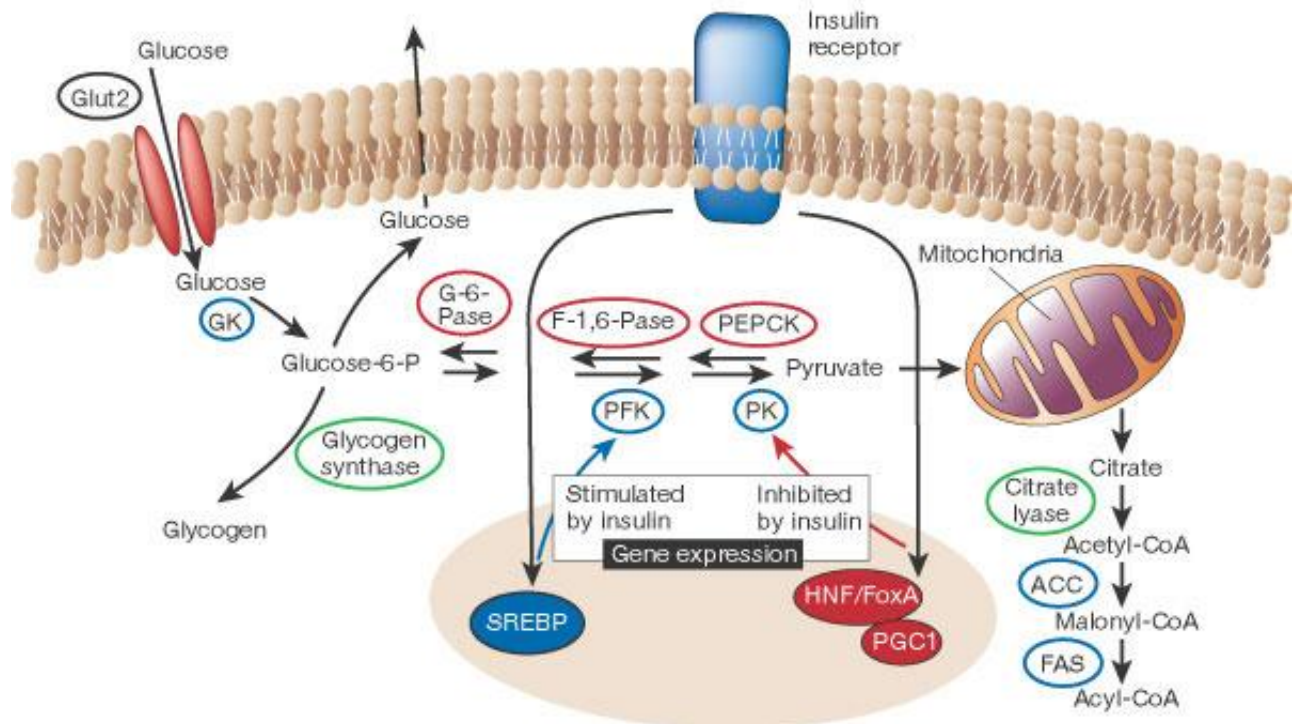


Figura 2- A regulação do metabolismo de glicose no fígado. A insulina estimula a expressão de genes que codificam enzimas glicolíticas e envolvidas na síntese de ácidos graxos (azul), enquanto inibe a expressão dos genes que codificam enzimas neoglicogênicas (vermelha) em hepatócitos. O hormônio também regula a atividade de algumas enzimas como glicogênio sintase e citrato liase (verde) através de mudanças no estado de fosforilação (SALTIEL e KAHN, 2001).

Na célula muscular e no adipócito, a insulina é importante para promover a captação de glicose, utilizá-la como fonte energética, bem como estocar o excedente, quais sejam, na forma de glicogênio ou na forma de gordura. A captação de glicose nestes tecidos depende como dito anteriormente, da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a superfície da célula, estimulada pela ação da insulina (BAVILONI et al., 2010). Assim como no fígado, no músculo esquelético a insulina estimula o depósito da glicose na forma de glicogênio através da inativação da enzima GSK-3 β e aumento da atividade da enzima glicogênio sintase através da ativação da proteína AKT (JENSEN et al., 2011). Em tecido adiposo, a insulina é responsável por reduzir a liberação de ácidos graxos inibindo o processo de lipólise e estimulando o processo de lipogênese. Além do mais, em indivíduos diabéticos, o metabolismo das lipoproteínas está prejudicado, pois a insulina exerce um efeito importante sobre as lipases, como a ativação da lipase lipoproteica (LLP) do endotélio vascular e a inibição da lipase hormônio sensível (LSH), presente no tecido adiposo. Na deficiência de insulina, a lipase hormônio sensível estará ativada, ocasionando a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos adipócitos, que são então liberados na circulação, contribuindo para a diminuição de peso corporal e elevação do substrato acetil-CoA, que é um precursor do colesterol. A ausência de insulina também inibirá a lipase lipoprotéica, diminuindo a captação dos triacilgliceróis transportados pelas lipoproteínas

(quilomicron ou VLDL) pelos tecidos periféricos permanecendo, portanto, na circulação (AHMANDIAN et al., 2007).

1.3. Tratamentos usuais para o *Diabetes mellitus* e o uso de plantas medicinais

Desde os anos 80, o tratamento para o diabetes vem se tornando cada vez mais inovador com a descoberta e incorporação de novas classes de fármacos, além de novas tecnologias para melhora e bem estar do paciente diabético. Os tratamentos atuais para o diabetes incluem a insulinoterapia, por meio do uso da insulina exógena, e o uso de fármacos hipoglicemiantes orais (HSU, LEE e CHANG, 2009). Os mesmos eram inicialmente divididos em secretagogos da insulina, como as sulfoniluréias (Glibenclamida) e a glinidas (fármacos que aumentam a secreção de insulina pelas células β do pâncreas), os inibidores da enzima alfa-glicosidase como acarbose e miglitol (reduzem a absorção intestinal de glicose), os que diminuem a produção hepática de glicose, como as biguanidas (Metformina) e aqueles que são sensibilizadores periféricos da ação da insulina, como as glitazonas. Atualmente, a esses fármacos antidiabéticos foram adicionadas mais duas classes de substâncias: os incretinomiméticos, introduzidas entre 2006 e 2007, como a exanatina e gliptinas, e os inibidores do transporte sódio-glicose nos túbulos renais, introduzidos em 2012, como a Dapagliflozina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). Os mecanismos de ação dos incretinomiméticos consistem no mimetismo da ação de substâncias chamadas incretinas, que são hormônios produzidos pelo pâncreas ou intestino, como o GLP-1. O mesmo é responsável por aumentar a secreção de insulina no pâncreas em resposta ao aumento de nutrientes no intestino (DAVIDSON et al., 2008). Já a ação dos inibidores do transporte sódio- glicose nos túbulos renais consiste na inibição da

reabsorção da glicose nos túbulos renais e, conseqüente, liberação na corrente sanguínea, independente da ação da insulina.

Apesar de novas tecnologias serem empregadas para a descoberta de fármacos e melhora do estado geral do paciente diabético, o aparecimento de reações adversas ainda é uma questão relevante relatada pelos pacientes. O uso da insulina exógena pode causar reações adversas de ordem metabólica como hipoglicemia e aumento do peso e imunológicas como reações alérgicas e locais, devido às aplicações. As sulfoniluréias e glinidas podem causar efeitos como aumento de peso, náuseas, vômitos, icterícias, anemias e hipersensibilidade. As buídanidas, como a metformina, podem causar transtornos gastrointestinais e déficit de vitamina B12. Os inibidores da enzima alfa-glicosidase podem, da mesma forma, causar transtornos gastrointestinais enquanto as gliptinas podem causar, além de perturbações gastrintestinais, edema periférico, infecções das vias respiratórias superiores e hipoglicemia (FERREIRA e CAMPOS, 2014).

O uso de fitoterápicos tem como objetivo ser uma forma auxiliar de terapêutica para pacientes diabéticos, tendo em conta que este tratamento complementar pode ter benefícios que se somam à terapêutica convencional (BORGES, BAUTISTA, GUILERA, 2008.). Nos últimos anos, as plantas medicinais têm sido alvo de pesquisas científicas para comprovação dos seus efeitos e melhor entendimento do mecanismo de ação e de seus componentes. Antes do advento da insulina exógena e dos hipoglicemiantes orais, o uso de plantas era a principal forma de controle do diabetes e suas complicações. Atualmente, mesmo com a utilização de drogas hipoglicemiantes sintéticas, os portadores de diabetes utilizam, com grande frequência, os tratamentos alternativos como as plantas medicinais, aplicando o conhecimento acumulado em sua

herança cultural, familiar ou mesmo por indicações de conhecidos (ALVES et al., 2007).

Atualmente, mais de 1200 plantas são listadas na literatura por possuírem atividade antidiabética (BAHARVAND – AHMANDI et al., 2016). Os compostos químicos encontrados nas plantas com propriedades medicinais incluem compostos fenólicos, alcalóides, flavonóides, terpenóides e glicosídeos e estão relacionados com as atividades apresentada pelas mesmas (ABDELL –HASSAN, ABDEL-BARRY e MOHAMMEDA, 2000).

Os mecanismos da ação hipoglicemiante das plantas podem ser relacionados com a capacidade das mesmas (ou seus princípios ativos) em diminuir o nível de glicose plasmática através da interferência em um ou mais processos envolvidos na homeostase glicêmica. Os mecanismos descritos até o momento pelos quais as plantas medicinais com atividade antidiabética reduzem os níveis plasmáticos da glicose são semelhantes aos dos hipoglicemiantes orais, como estimulação da síntese e/ou secreção de insulina a partir das células β pancreáticas, regeneração das células β , melhora na sensibilidade à insulina (aumento de captação da glicose pelo tecido adiposo e muscular), mimetismo da ação da insulina, alteração da atividade de algumas enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e diminuição da absorção intestinal de carboidratos (TANIRA, 1994).

1.4. Família Myrtaceae, gênero *Myrcia* e espécie *Myrcia bella*

A família Myrtaceae é considerada a nona maior família de Angiospermas, incluindo árvores e arbustos distribuídos principalmente nos centros tropicais, como América do Sul, Austrália e Ásia tropical. É composta por cerca de 132 gêneros e 5671 espécies (GOVAERTS et al., 2014). No Brasil, a família Myrtaceae é uma das maiores

famílias da flora do país, com cerca de 23 gêneros e 1034 espécies distribuídos em todas as regiões e formações florestais (GOVAERTS et al., 2014; SOUZA e LORENZI, 2008), principalmente na Mata Atlântica e no Cerrado, sendo o gênero *Myrcia* um dos mais importantes (LANDRUM e KAWASAKI, 1997).

No Brasil são listadas cerca de 260 espécies de *Myrcia* encontradas nos diferentes biomas e nas cinco regiões do país. Espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular como adstringentes e diuréticos, assim como para o tratamento de enfermidades como diabetes, hipertensão e úlceras gástrica (PEPATO et al., 1993; RUSSO et al., 1990). Além disso, são também importantes fontes de óleos essenciais (CASCAES et al., 2015).

Cascaes et al. (2015) descreveram diversas atividades biológicas dos óleos essenciais das espécies de *Myrcia* que podem ser produzidos a partir das folhas, flores, caules e frutos. Dentre suas atividades, incluem aquelas anti-inflamatória e antinociceptiva, antimicrobiana e larvicida, antiproliferativa, além da capacidade antioxidante. Do mesmo modo, os mesmos autores descreveram os efeitos farmacológicos dos extratos e compostos isolados das espécies de *Myrcia*, como atividade hipoglicêmica e hipolipidêmica, efeitos antiobesidade, efeitos fitotóxicos e potencial alopático, assim como efeitos antioxidantes e hepatoprotetores.

O uso tradicional mais conhecido e citado dentro do gênero *Myrcia* refere-se a plantas conhecidas popularmente no Brasil como “pedra-hume-caá”, “pedra-ume-caá” ou insulina vegetal. As espécies conhecidas pelo uso de infusão das folhas ou da planta inteira para o tratamento do diabetes são *M. puniceifolia*, *M. speciosa*, *M. amazonica*, *M. citrifolia*, *M. guianensis*, *M. multiflora*, *M. salicifolia*, *M. sylvatica*, *M. uniflora* (SILVA et al., 2015). O extrato metanólico das folhas de *M. multiflora* apresentou atividade

inibitória sobre as enzimas alfa glicosidase e aldose redutase e diminuiu os níveis de glicose em camundongos diabéticos induzidos com Aloxana (YOSHIKAWA, 1998). Ferreira et al. (2011) demonstraram que um composto isolado da mesma espécie, apresentou atividade hipolipidêmica e efeitos anti obesidade através da inibição da absorção de triglicerídeos intestinais e também da enzima lipase pancreática em camundongos alimentados com dieta hipercalórica. *Myrcia guianensis*, uma espécie proveniente da Amazônia, ao ser administrada na forma de infusão em ratos, apresentou atividades hipoglicemiante e hipolipidêmica (MALHEIROS et al., 2010). A espécie *M. uniflora* já é comercialmente vendida como extrato seco em cápsulas ou tinturas para o tratamento do diabetes. Outras espécies de *Myrcia* também apresentam outros usos tradicionais descritos na literatura, como *M. bracteata*, usada para o tratamento de dispepsias, *M. ovata*, usada para o tratamento de doenças gástricas e diarreias e *M. guianensis* que, além do uso conhecido para o tratamento do diabetes, é também usada pelos habitantes da região amazônica para neutralizar venenos de cobra (CASCAES et al., 2015).

Dentre as várias espécies de *Myrcia* encontradas nos cerrados do estado de São Paulo, *Myrcia bella*, popularmente conhecida como “mercurinho” (POTT, POTT e SOUZA, 2006) é caracterizada como um arbusto que floresce de outubro a novembro e frutifica de novembro a dezembro (LORENZI, 2014) (Fig. 3).



Figura 3 – Arbusto da espécie *Myrcia bella* no Jardim Botânico de Bauru, SP (crédito Luiz Leonardo Saldanha).

Os trabalhos com a espécie *M. bella* ainda são escassos na literatura. Há atualmente três trabalhos publicados a cerca da mesma, sendo apenas dois relacionados à atividade biológica e apenas o trabalho do nosso grupo descrevendo a atividade hipoglicemiante da planta. Saldanha et al. (2013) elucidaram o perfil químico do extrato bruto das folhas de *M. bella*, revelando a presença de ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados derivados de quercetina e miricetinas, compostos estes que apresentam uma grande diversidade de trabalhos relacionados às suas atividades biológicas e envolvidas na melhora do diabetes (Fig. 4).

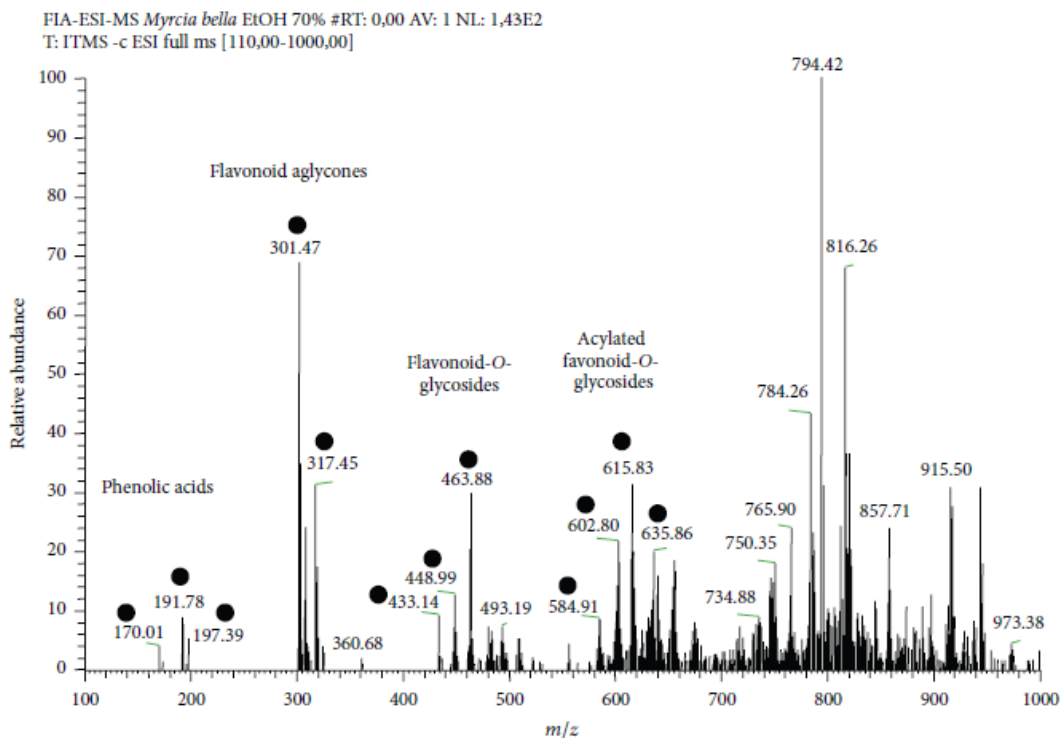


Figura 4 – Perfil químico do extrato de *Myrcia bella* (SALDANHA et al., 2013).

Recentemente, Serpeloni et al. (2015) encontraram que o extrato bruto de *M. bella* induz citotoxicidade e morte celular por necrose em células tumorais *in vitro*, apresentou efeito antiproliferativo nas mesmas células assim como atividade antioxidante e efeito protetor contra desordens gastrointestinais. Dados do nosso grupo mostraram que o tratamento com o mesmo extrato, na concentração de 600 mg/kg em camundongos com diabetes do tipo 1, foi eficaz na diminuição da glicemia e melhora do quadro diabético (VAREDA et al., 2014). Os mesmo dados publicados pelo nosso grupo mostraram que o tratamento com o extrato em uma concentração inferior de 300 mg/kg não foi capaz de diminuir a glicemia de jejum de camundongos diabéticos (Fig. 5). Desse modo, foi escolhida a maior concentração apresentada para dar continuidade aos experimentos propostos.

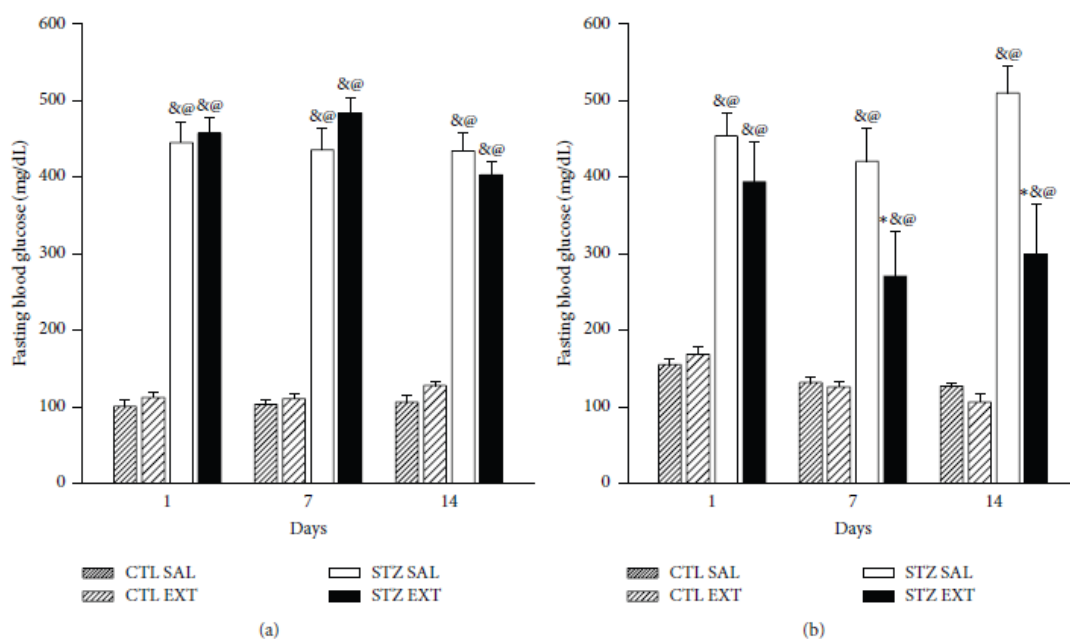


Figura 5 – Efeitos da administração de *Myrcia bella* (300 ou 600 mg/kg) na glicemia de jejum de camundongos (VAREDA et al., 2014).

Sabe-se que extratos brutos são compostos por uma grande diversidade de substâncias químicas. O fato de uma planta apresentar diversos princípios ativos pode possibilitar interações sinérgicas que elevam a eficácia do extrato bruto comparado ao composto isolado (PELT, 1979). O uso de extratos brutos na literatura para estudos biológicos compreendem, em sua grande maioria, o uso de concentrações mais elevadas em relação às utilizadas com compostos isolados, uma vez que, é necessária uma maior massa dos mesmos para a obtenção de uma resposta biológica. Desse modo e, uma vez que a menor concentração do extrato não produziu resposta, justifica-se a concentração de 600 mg/kg utilizada para o tratamento com o extrato bruto de *Myrcia bella* e sua continuidade nos estudos.

Os estudos sobre a ação do extrato bruto de *Myrcia bella* em modelos experimentais assim como seu aprofundamento, é de grande importância científica uma vez que, há ainda muito poucos trabalhos apresentados na literatura sobre o mesmo e, os

poucos trabalhos apresentados mostram-se promissores no tratamento de doenças que apresentam alta incidência na população mundial. Uma vez que os dados iniciais obtidos pelo nosso grupo mostram-se promissores para o tratamento do diabetes, buscamos avaliar os mecanismos de ação que levaram à atividade hipoglicemiante obtida durante o mestrado da aluna. O projeto baseia-se na busca dos mecanismos moleculares envolvidos em tal atividade em tecidos periféricos a fim de desvendar as principais vias ativadas pela administração do extrato. Desse modo, compreendendo-se os mecanismos envolvidos, abrem-se futuras portas para o desenvolvimento de um agente fitoterápico para o tratamento e melhora do diabetes em humanos.

2. *Objetivos*

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho foi de investigar os mecanismos moleculares envolvidos no tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella*, nos processos de captação e armazenamento de glicose em fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de genes e proteínas envolvidos nos processos de glicogênese, glicogenólise e neoglicogênese, em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos, tais como glicogênio sintase, glicose-6-fosfatase e PEPCK.

- Avaliar os processos de captação e estoque de glicose em músculo gastrocnêmio através da avaliação da expressão de genes e de proteínas da via de sinalização de insulina como, PI3-K, AKT e GLUT 4, assim como suas formas fosforiladas, além de GSK-3 β e glicogênio sintase.

- Avaliar os processos de captação de glicose em tecido adiposo branco retroperitoneal através da avaliação da expressão de proteínas da via de sinalização de insulina como, PI3-K, AKT e GLUT 4, bem como suas formas fosforiladas.

- Avaliação do conteúdo de insulina pancreática

- Avaliar a atividade das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase incubadas em diferentes concentrações do extrato bruto de *Myrcia bella in vitro*.

- Avaliar o efeito da administração do extrato bruto de *Myrcia bella* em camundongos normoglicêmicos após ingestão de amido e maltose sobre os níveis glicêmicos.

3. Materiais e métodos

3.1 - Obtenção do extrato e análises farmacognósticas e químicas

Conforme o aspecto multidisciplinar do grupo envolvido no projeto Temático aprovado pela FAPESP sob o protocolo número 09/52237-9 e encerrado no ano de 2016, a coleta e identificação do material botânico, a obtenção do extrato, a etapa farmacognóstica e o isolamento e identificação dos principais constituintes químicos do extrato ocorreram sob a responsabilidade de outros membros do grupo, sobretudo do Prof. Dr. Wagner Vilegas (IQ, UNESP, Araraquara) e da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro (FC, UNESP, Bauru). As folhas de *M. bella* foram coletadas em Novembro de 2010 no Jardim Botânico Municipal de Bauru, SP (22°20'30" S e 49°00'30"W). A exsicata foi preparada, identificada e depositada no Herbário da UNESP de Bauru – UNBA (Bauru, SP) sob número 5508. Folhas frescas foram secas a 40°C durante 48 horas. As folhas trituradas (1,3 kg) foram extraídas com EtOH/H₂O (7:3 v/v) por percolação à temperatura ambiente. O filtrado foi concentrado para secagem sobre pressão reduzida a 40°C, obtendo-se o extrato hidroalcoólico (364 g) (SALDANHA et al., 2013).

3.2 - Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albino machos com 60±10 dias de idade, pesando entre 35-40 g, provenientes do Biotério Central da UNESP, localizado no Campus de Botucatu, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (23 ± 2°C) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*. Para formar os grupos experimentais os camundongos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos (n=8):

CTL SAL: camundongos normoglicêmicos tratados com salina.

CTL EXT: camundongos normoglicêmicos tratados com extrato bruto de *Myrcia bella* diluído em salina.

STZ SAL: camundongos induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com salina.

STZ EXT: camundongos induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com extrato bruto de *Myrcia bella* diluído em salina.

3.3- Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizada por meio de uma injeção única de estreptozotocina (STZ) na dose de 150 mg/kg, em camundongos normoglicêmicos mantidos em jejum de 12 a 14 horas. A média da glicemia inicial dos camundongos normoglicêmicos foi de 130 mg/dl. A STZ foi dissolvida em tampão citrato com pH 4,5 e injetada por via intraperitoneal. Os animais foram deixados em jejum por mais 3 horas e, após esse período, receberam solução de glicose 30% durante 24 horas. Após um período de sete dias, a glicemia dos camundongos foi mensurada com glicosímetro (One Touch – Johnson & Johnson) para verificação do estabelecimento do diabetes. Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 250 mg/dl foram considerados diabéticos e incluídos nos respectivos grupos (VAREDA et al., 2014). A média da glicemia dos camundongos diabéticos após sete dias da indução foi de 490 mg/dl.

3.4 - Tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella*

Camundongos dos grupos CTL EXT e STZ EXT receberam diariamente, por gavagem, extrato bruto de *Myrcia bella* diluído em veículo salina na dose de 600 mg/kg

de peso corpóreo durante 21 dias consecutivos. Os animais CTL SAL e STZ SAL receberam apenas veículo salina na dose de 1 ml/kg. A gavagem foi realizada uma vez ao dia, sempre ao mesmo horário, entre 8 e 9 horas da manhã (VAREDA et al., 2014). Ao final do tratamento, os camundongos alimentados foram eutanaziados por CO₂, decapitados e 100 mg de fígado e músculo gastrocnêmio foram coletados para análise da expressão gênica e proteica através da técnica de PCR em tempo real e Western blot, respectivamente e porções de tecido adiposo branco retroperitoneal foram coletados para análise da expressão proteica através da técnica de Western blot. O pâncreas inteiro foi coletado, fixado, emblocado em parafina e utilizado para análises imunohistoquímicas.

3.5- Extração proteica e Western Blot

Porções de fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo branco retroperitoneal foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) em coquetel antiprotease a 4°C. Após 20 minutos de centrifugação em 12.000 rpm e 4°C, o conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi determinado por espectrofotometria por meio do método de Bradford, utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. Aliquotas entre 80 e 100 µg de proteína total foram fervidas a 100°C por 4 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas em sistema de eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida com o tamanho dos poros adequado para cada peso molecular. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS em voltagem constante de 120 Volts. A membrana foi, então, saturada com solução bloqueadora contendo 5% de albumina

em solução basal (10 mM Tris base, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) durante 10 minutos no aparelho SNAP i.d. 2.0 (Millipore). Em seguida a membrana foi lavada três vezes com solução basal. As proteínas foram detectadas na membrana após incubação durante 10 minutos no SNAP i.d. 2.0 (Millipore) com anticorpo primário específico para cada uma (PI3-K – sc 56838, p-PI3-K – sc 12929, AKT – sc 1619, p-AKT – sc 7985, GLUT4 – sc 1608, glicogênio sintase – sc 99029, PEPCK – sc 32879, glicose – 6 – fosfatase – sc 27198, p-GSK-3 β – sc 81494 , GSK-3 β —sc 9166 - Santa Cruz Biotechnology) em solução basal contendo albumina 3%, seguida de três lavagem consecutivas e incubação por mais 10 minutos com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP (GAPDH – sc 25778 - Santa Cruz Biotechnology) em solução basal contendo 3% de albumina. As membranas foram lavadas e incubadas com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) e expostas ao filme auto-radiográfico (Kodak T-Mat G/RA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria.

3.6- Extração de RNA

Porções de 100 mg de fígado e músculo gastrocnêmio foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) a 4°C em 1 ml de Trizol (Invitrogen). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 200 μ l de clorofórmio às amostras e as mesmas foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo eppendorf e resuspendida com isopropanol de acordo com o volume recuperado. As amostras foram mantidas em Freezer -20° C durante 10 minutos para ajudar na formação do pellet e então novamente centrifugados a 13.000 g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido em 500 μ l de

álcool 75% preparado com água DEPC. As amostras foram centrifugadas a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C e novamente o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 500 µl de álcool absoluto e centrifugado novamente a 8.000 g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 30 µl de água tratada com DEPC para dissolução do pellet. As amostras foram diluídas em água DEPC e lidas nos espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific) . As razões 260/280 e 260/230 obtidas no Nanodrop foram mensuradas para verificar a pureza das amostras.

3.7 - Transcrição Reversa e síntese de cDNA

Após a quantificação de RNA em cada amostra, a reação de transcrição reversa foi realizada através de kit (QuantiTect Reverse Transcription Kit – Qiagen). Foi adicionado 2 µl da solução de gDNA Wipeout Buffer proveniente do kit. As amostras foram então aquecidas a 42°C em termociclador (Applied Biosystems) durante 2 minutos. Em seguida foram incubadas durante 1 minuto em gelo. Foram adicionados 1 µl do conteúdo de Quantiscript Reverse Transcriptase, 1 µl de RT Primer Mix e 1 µl de Quantiscript RT Buffer provenientes do kit. As amostras foram novamente aquecidas em termociclador (Applied Biosystems) a 42° C durante 30 minutos e em seguida durante 95°C durante 3 minutos. Foi adicionado as amostras 60 µl de água Rnase- Free proveniente do kit e então montada a reação de PCR.

3.8 -PCR em tempo real

Para a análise da expressão gênica foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós-transcrição reversa (qRT-PCR). A quantificação dos produtos formados durante os ciclos de amplificação foi realizada com reagente

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, com um volume final de reação de 5 µl. Para tanto, foram pipetados 1 µl de cDNA (1000 ng), 0,25 µl de cada sonda específica para cada gene (G6Pc - Mm00839363_m1; GSK3b - Mm00444911_m1; Gys1 - Mm01962575_s1; Gys2- Mm01267381_m1; Pik3r1 - Mm00803160_m1; AKt1 - Mm01331626_m1; Slc2a4 - Mm01245502_m1; Pck1 - Mm01247058_m1; Gapdh - Mm03302249_g1) (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems), 2,5 µl de TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e 1,25 µl com água livre de RNAses. A reação foi realizada através de 40 ciclos em Step One Plus (Applied Biosystems). Os dados obtidos foram analisados utilizando o método de quantificação relativa da expressão gênica ($\Delta\Delta C_t$), que permite quantificar diferenças no nível de expressão de um gene específico entre as amostras dos diferentes grupos. A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene controle endógeno (GADPH).

3.9 - Análises histológicas

3.9.1 – Processamento tecidual

Os pâncreas inteiro de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos foram retirados e fixados em paraformaldeído 4%. Após a fixação, os tecidos foram lavados em água corrente, desidratados em alcoóis de diferentes porcentagens, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Paraplast Plus, Sigma-Aldrich).

3.9.2- Imunohistoquímica para detecção de insulina em pâncreas

Os blocos de parafina contendo o pâncreas inteiro dos camundongos de todos os grupos (n=5) foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm, com três intervalos de 200 µm cada, produzindo 3 diferentes lâminas do pâncreas de cada animal. Para as análises imunohistoquímicas, os cortes foram desparafinizados com diferentes concentrações de xilol e hidratados em diferentes concentrações de alcoóis. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato quente (pH 6,0) durante 5 minutos. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado em solução de H₂O₂ diluída em PBS durante 10 minutos no escuro e o bloqueio dos sítios de ligação não específico foi realizado com 3% de leite diluído em PBS durante 1 hora. Após o bloqueio, o anticorpo anti-insulina (Santa Cruz Biotechnology) foi incubado a 4°C, overnight em câmara escura. O complexo antígeno-anticorpo foi detectado utilizando anticorpo secundário marcado com peroxidase (IGg-HRP) (ab 6789, Abcam) diluído em BSA 1% durante 1 hora. A revelação da imunorreatividade- cromogênio DAB (3,3 - diaminobenzidina) foi realizada diluindo-se 50 µl de DAB em 4,5 ml de PBS e 4 ml H₂O₂ durante 5 minutos. Para contra-coloração, as lâminas foram mergulhadas em hematoxilina e então, desidratadas, diafanizadas e montadas. Foram observadas as 3 lâminas de cada animal para semi- quantificar a marcação da insulina, realizada em comparação ao grupo CTL SAL, em microscópio óptico Axioplan 2 (Zeiss). As imagens foram obtidas utilizando o software AxioVision 2.

3.10 – Ensaio enzimático *in vitro* para avaliação das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase

3.10.1 Ensaios da atividade enzimáticas das glicosidases

Os experimentos *in vitro* foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. A atividade específica da alfa glicosidase e da alfa amilase foi avaliada em um volume final de 50 µl em microplacas de 384 poços. A mistura de reação para a maltase de levedura contendo tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7.0) foi pré-incubada à 37°C por 5 minutos, a reação foi iniciada pela adição PNP-G (1 mM). A mistura de reação para a alfa amilase pancreática suína contendo tampão HEPES (50 mM, pH 7.0), CaCl₂ (5 mM), NaCl (100 mM) foi pré-incubada à 37°C por 5 minutos, e então, a reação foi iniciada pela adição de CNPG3 (1 mM). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas automatizado (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), onde foi medido taxa de aparecimento de p-nitrofenol em comprimento de onda de 405 nm. A velocidade inicial foi obtida pela inclinação da reta de regressão linear calculada a partir de 0-5 minutos iniciais (porção linear) da curva de progresso da reação. Experimentos controle foram realizados e demonstraram que concentrações de DMSO até 5% podem ser utilizadas sem afetar significativamente as atividades enzimáticas.

3.10.2 - Determinação da inibição da atividade enzimática (IC_{50})

As reações foram realizadas conforme descrito acima. A concentração de inibidor que promove 50% de inibição da atividade enzimática (IC_{50}) foi determinada pela titulação de pelo menos oito concentrações do extrato bruto (312,5; 78,125; 39,06; 19,53; 9,77; 4,88; 2,44; 1,22; 0,61; 0,31; 0,15; 0,08 µg/ml) de *M. bella* juntamente com cada enzima durante 5 minutos a 37 °C. Os valores de IC_{50} foram determinados no software Sigmaplot 12.0 (Systat software Inc, USA) pelo ajuste dos dados de atividade residual e concentração de inibidor à equação logarítmica de 4 parâmetros: Ativ. Res. =

$\text{min} + (\text{max}-\text{min}) / (1 + ([I]/IC_{50})^{-\text{Coef.Hill}})$). A acarbose foi utilizada como controle positivo e as reações foram realizadas em quadruplicata.

3.11- Ensaio *in vivo* para avaliação das enzimas alfa amilase e alfa glicosidase

Camundongos Swiss albino machos (60±10 dias) normoglicêmicos foram mantidos em jejum de 10-12 horas e então foram divididos em três grupos: CTL SAL (camundongos normoglicêmicos tratados com salina), AC (camundongos normoglicêmicos tratados com acarbose 10 mg/kg (controle positivo)) e MB (camundongos normoglicêmicos tratados com o extrato bruto das folhas de *M. bella* 600 mg/kg). A glicemia de jejum foi medida no tempo zero. Os animais foram em seguida tratados por gavagem oral com salina, acarbose ou extrato de *M. bella* conforme a divisão dos grupos e, após 10 minutos, receberam também por via oral soluções de amido ou maltose na concentração de 2 g/kg. Em seguida, a glicemia foi mesurada nos tempos 30, 60 e 120 minutos utilizando glicosímetro (One touch, Johnson & Johnson).

3.12 -Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test* de *Newman-Keuls*. O nível de significância adotado foi $p<0.05$.

4. Resultados

4.1 Análise das expressões de mRNA e das proteínas glicogênio sintase (Gys2), PEPCK (Pck1) e glicose-6- fosfatase (G6Pc) em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos

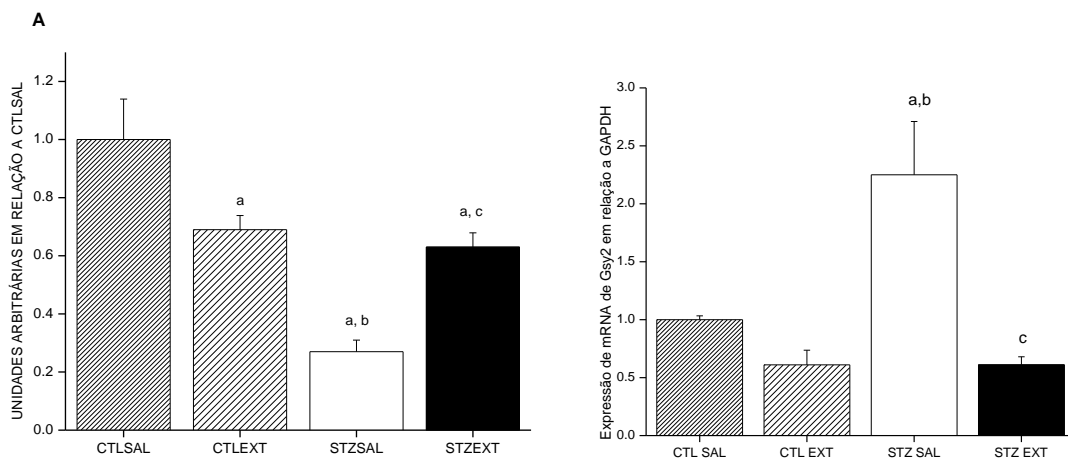
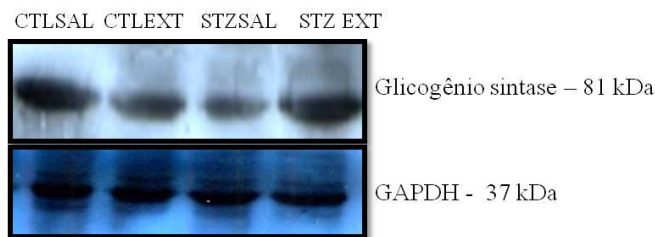
Foram analisadas as expressões das proteínas e dos genes que codificam a glicogênio sintase, envolvida no processo de armazenamento de glicose, PEPCK e glicose-6-fosfatase, envolvidas nos processos de liberação de glicose do fígado para a corrente sanguínea. Houve diminuição na expressão da enzima glicogênio sintase no grupo STZ SAL ($0,27 \pm 0,03$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,13$ e $0,69 \pm 0,04$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). Também ocorreu diminuição da expressão da mesma no grupo STZ EXT ($0,63 \pm 0,04$) em relação à CTL SAL ($1 \pm 0,13$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). O tratamento com extrato de *M. bella* provocou aumento na expressão da glicogênio sintase nos animais do grupo STZ EXT ($0,63 \pm 0,04$) em relação ao grupo STZ SAL ($0,27 \pm 0,03$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). Camundongos do grupo normoglicêmico CTL EXT apresentaram diminuição na expressão da mesma ($0,69 \pm 0,04$) em relação à CTL SAL ($1 \pm 0,1$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). Em relação à expressão de mRNA do gene Gys2 que codifica a enzima glicogênio sintase, ocorreu aumento no grupo STZ SAL ($2,25 \pm 0,46$) em relação aos camundongos dos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,03$ e $0,61 \pm 0,12$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). Observamos diminuição na expressão do mRNA no grupo dos camundongos STZ EXT ($0,61 \pm 0,07$) em relação a grupo STZ SAL ($2,25 \pm 0,46$), (Fig. 6 A, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de mRNA do gene Gys2 entre os grupos CTL SAL e CTL EXT.

A figura 6 B mostra a expressão da enzima PEPCK e do respectivo gene que codifica a mesma. Ocorreu aumento significativo na expressão da enzima PEPCK no grupo STZ SAL ($2,37 \pm 0,42$) quando comparado aos grupos CTL SAL e CTL EXT (1

$\pm 0,27$ e $1 \pm 0,21$), (Fig. 6 B, $p < 0,05$). O tratamento com o extrato de *M. bella* promoveu diminuição na expressão da mesma no grupo STZ EXT ($0,87 \pm 0,21$) em relação ao grupo STZ SAL ($2,37 \pm 0,42$), (Fig. 6 B, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão da enzima PEPCCK entre os grupos STZ EXT ($0,87 \pm 0,21$) em relação à CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,27$ e $1 \pm 0,21$). Também não houve diferença na expressão da mesma entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA do gene Pck1 que codifica a enzima PEPCCK, observamos aumento na expressão do mesmo em camundongos diabéticos de ambos os grupos STZ SAL e STZ EXT ($3,96 \pm 0,04$ e $2,5 \pm 0,19$) quando comparado aos grupos dos camundongos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,05$ e $0,63 \pm 0,08$), (Fig. 6 B, $p < 0,05$). Camundongos diabético do grupo STX EXT apresentaram diminuição na expressão de mRNA do gene Pck1 ($2,5 \pm 0,19$) quando comparados aos camundongos do grupo STZ SAL ($3,96 \pm 0,04$), (Fig. 6 B, $p < 0,05$). O tratamento com o extrato também diminuiu a expressão do mesmo gene em camundongos normoglicêmicos CTL EXT ($0,63 \pm 0,08$) comparado ao grupo dos CTL SAL ($1 \pm 0,05$), (Fig. 6 B, $p < 0,05$).

A expressão da enzima glicose-6-fosfatase aumentou no fígado de camundongos do grupo STZ SAL ($1,47 \pm 0,14$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,12$ e $0,97 \pm 0,18$), (Fig. 6 C, $p < 0,05$). O tratamento com extrato de *M. bella* promoveu diminuição na expressão da enzima glicose-6-fosfatase nos camundongos do grupo STZ EXT ($0,89 \pm 0,06$) em relação aos camundongos do grupo STZ SAL ($1,47 \pm 0,14$), (Fig. 6 C, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão da mesma entre o grupo STZ EXT em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT. Também não houve diferença na expressão da mesma entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA do gene G6Pc que codifica a proteína glicose- 6-fosfatase , ocorreu aumento da expressão

no grupo dos camundongos STZ SAL ($1,48 \pm 0,23$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,09$ e $0,62 \pm 0,15$), (Fig. 6 C, $p < 0,05$). O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* promoveu diminuição na expressão de mRNA de G6Pc no grupo STZ EXT ($0,77 \pm 0,09$) quando comparado aos camundongos do grupo STZ SAL ($1,48 \pm 0,23$), (Fig. 6 C, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de mRNA do mesmo gene entre os grupos CTL SAL e CTL EXT.



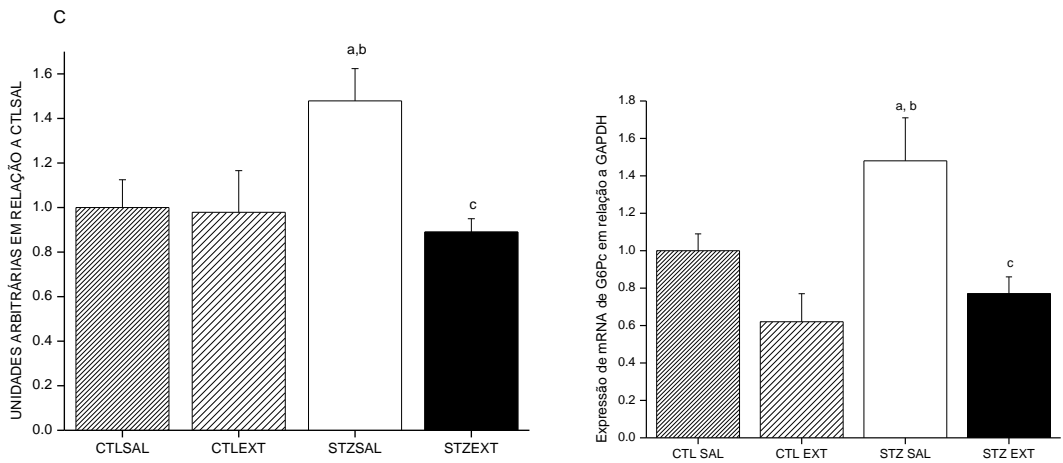
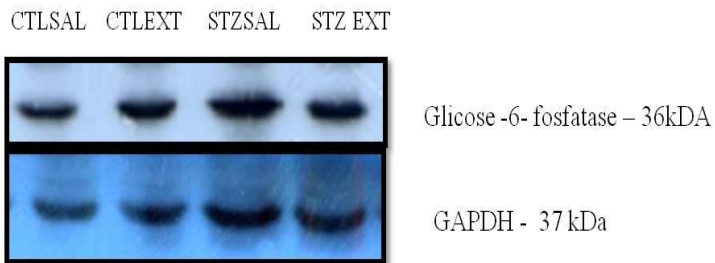
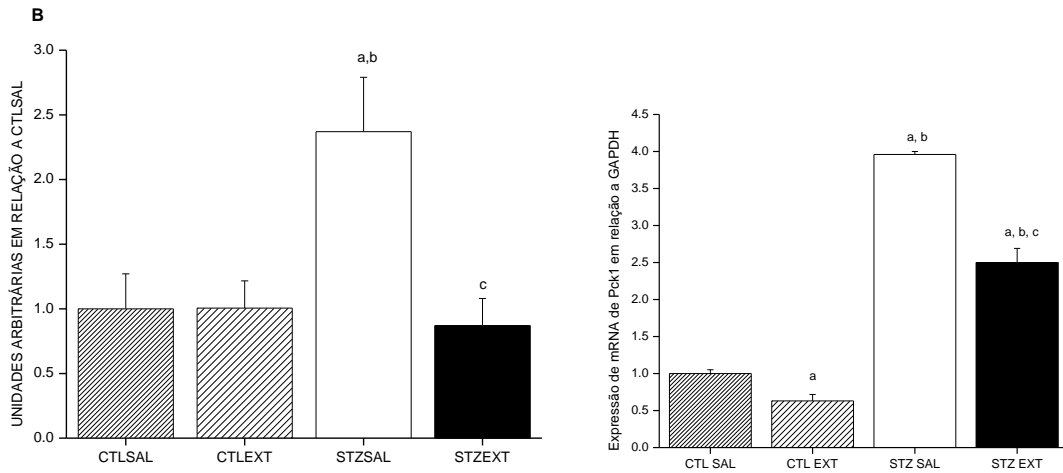
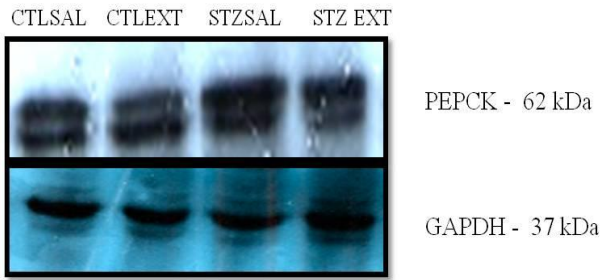


Figura 6– Expressões proteica e de mRNA de glicogênio sintase (**A**), PEPCK (**B**) e glicose-6-fosfatase (**C**) em fígado de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT) em relação à GAPDH. a vs. CTL SAL, b vs. CTL EXT, c vs. STZ SAL, $p < 0.05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test* de *Newman-Keuls*.

4.2 - Análise da expressão de mRNA e das proteínas PI3-K (Pik3r1) , AKT (AKt1), GLUT4 (Slc2a4), GSK-3 β (GSK3b) e glicogênio sintase (Gys1) em músculo gastrocnêmio de camundongos normoglicêmicos e diabéticos

Foram avaliadas as expressões de mRNA dos genes codificadores das proteínas PI3-K (Pik3r1), AKT (AKt1) , GLUT4 (Slc2a4), GSK-3 β (GSK3b) e glicogênio sintase (Gys2) assim como suas expressões. A figura 7 A representa a relação entre a expressão da proteína PI3-K na sua forma fosforilada sob sua forma total assim como a expressão de mRNA. A análise da expressão proteica demonstrou diminuição na expressão da proteína PI3-K no grupo STZ SAL ($0,4 \pm 0,06$) em relação à CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,12$ e $0,99 \pm 0,06$), (Fig. 7 A, $p < 0.05$). Não houve diferença na expressão da mesma no grupo STZ EXT ($0,66 \pm 0,14$) em relação à STZ SAL ($0,4 \pm 0,06$). Também não ocorreu diferença na expressão de PI3-K entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA de Pik3r1, houve aumento na expressão do mesmo nos camundongos dos grupos STZ SAL e STZ EXT ($2,83 \pm 0,37$ e $3,78 \pm 0,38$) em relação aos grupos CTL SAL e CT EXT ($1 \pm 0,1$ e $1,23 \pm 0,3$), (Fig. 7 A, $p < 0.05$). Ocorreu aumento na expressão de mRNA do gene Pik3r1 no grupo STZ EXT ($3,78 \pm 0,38$) em relação à STZ SAL ($2,83 \pm 0,37$, $p < 0.05$), (Fig. 7 A, $p < 0.05$). Não observamos diferença entre os grupos CTLSAL e CTL EXT.

A figura 7 B representa a relação entre a expressão da proteína AKT na sua forma fosforilada sob sua forma total assim como a expressão de mRNA. Em relação à expressão proteica, notamos diminuição na expressão da AKT no grupo STZ SAL e STZ EXT ($0,41 \pm 0,03$ e $0,6 \pm 0,04$) em relação ao grupo CTL SAL ($1 \pm 0,15$), (Fig. 7 B, $p < 0,05$). Nenhuma diferença significativa foi observada com relação à expressão da mesma entre os grupos STZ EXT ($0,6 \pm 0,04$) e STZ SAL ($0,41 \pm 0,03$). Também não notamos diferença na expressão da AKT entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA do gene AKT1, não houve diferença na expressão do mesmo entre os grupos STZ SAL e STZ EXT ($0,78 \pm 0,1$ e $1,61 \pm 0,2$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1,2 \pm 0,1$ e $1,08 \pm 0,2$), (Fig. 7 B). O tratamento com extrato de *M. bella* promoveu aumento na expressão de mRNA do gene AKT1 no grupo STZ EXT ($1,61 \pm 0,2$) em relação ao grupo STZ SAL ($0,78 \pm 0,1$), (Fig. 7 B, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão do mesmo entre os grupos CTL SAL e CTL EXT.

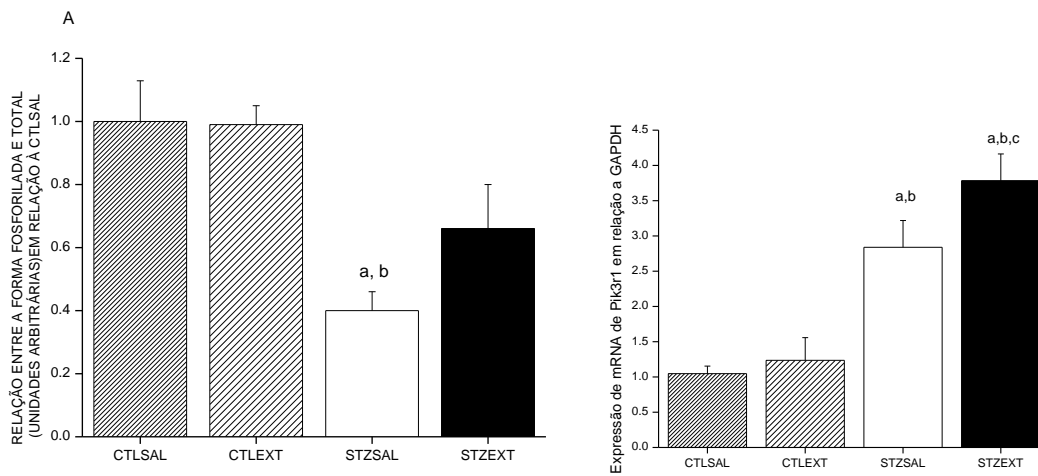
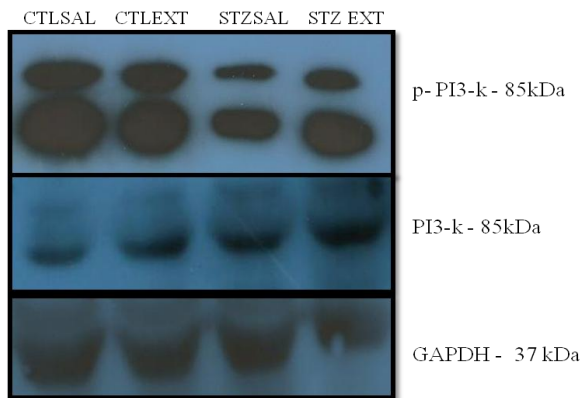
O aumento da translocação das vesículas contendo transportadores de glicose do tipo GLUT 4 está envolvido com a captação de glicose no músculo esquelético. Notamos diminuição na expressão da mesma nos grupos STZ SAL e STZ EXT ($0,43 \pm 0,05$ e $0,63 \pm 0,07$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,1$ e $1,08 \pm 0,08$), (Fig. 7 C, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão da GLUT 4 entre os grupos STZ EXT ($0,63 \pm 0,07$) e STZ SAL ($0,43 \pm 0,05$). Também não ocorreu diferença na expressão da mesma entre os grupos CTL SAL E CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA do gene Slc2a4 que codifica a proteína GLUT4, observamos diminuição na expressão do mesmo no grupo STZ SAL ($0,55 \pm 0,06$) em relação ao grupo CTL SAL ($1 \pm 0,1$), (Fig. 7 C, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão do mesmo mRNA entre

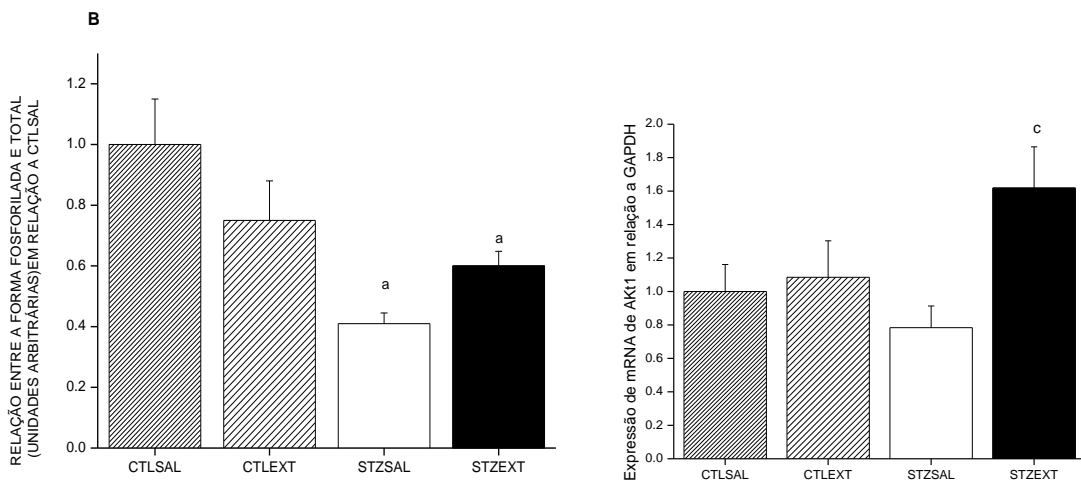
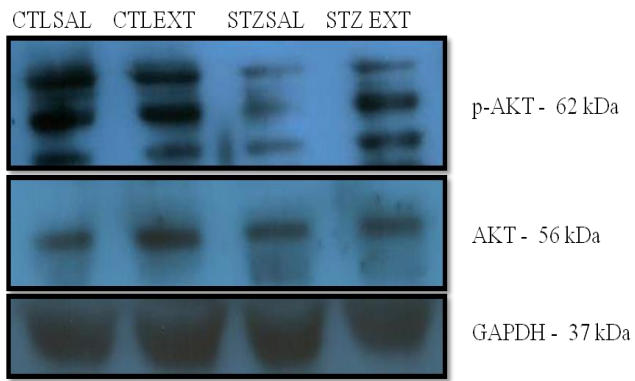
os grupos STZ EXT ($0,87 \pm 0,2$) e STZ SAL ($0,55 \pm 0,06$). Não houve também diferença na entre os grupos CTL SAL e CTL EXT.

A fim de analisar a expressão das enzimas envolvidas no estoque de glicogênio em músculo esquelético, avaliou-se a expressão das enzimas glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK-3 β) e glicogênio sintase. A análise da relação da expressão da proteína GSK-3 β na sua forma fosforilada sob sua forma não mostrou diferença estatística na expressão da mesma nos grupos STZ SAL e STZ EXT ($2,46 \pm 0,44$ e $1,84 \pm 0,51$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,16$ e $1,44 \pm 0,32$). Não houve diferença na expressão da mesma entre os grupos STZ EXT ($1,84 \pm 0,51$) e STZ SAL ($2,46 \pm 0,44$). Também não observamos diferença na expressão da mesma entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA de GSK3b que codifica a proteína GSK-3 β , não houve diferença em ambos os grupos STZ SAL e STZ EXT ($1,25 \pm 0,15$ e $1,49 \pm 0,43$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,01$ e $0,76 \pm 0,12$). Não houve diferença na expressão de mRNA entre os grupos STZ SAL ($1,25 \pm 0,15$) e STZ EXT ($1,49 \pm 0,43$). Também não houve diferença entre os grupos CTL SAL e CTL EXT (Fig. 7 D).

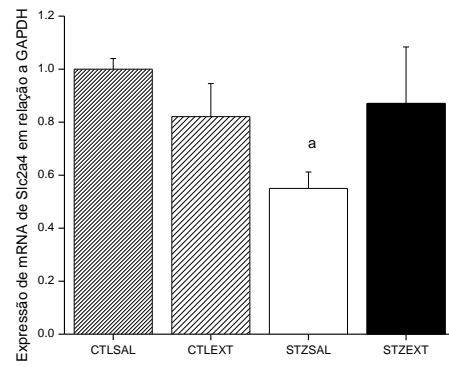
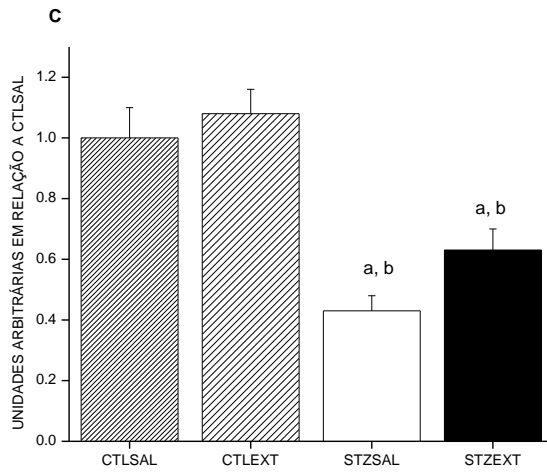
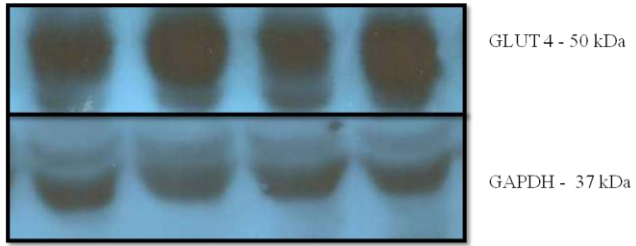
A análise da expressão da enzima glicogênio sintase mostrou diminuição na expressão da mesma nos grupos STZ SAL ($0,48 \pm 0,1$) em relação à CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,13$ e $1,14 \pm 0,17$) e no grupo STZ EXT ($0,62 \pm 0,13$) em relação à CTL EXT ($1,14 \pm 0,17$), (Fig. 7 E, $p < 0,05$). Não foi observada diferença na expressão da mesma entre os grupos STZ EXT ($0,62 \pm 0,13$) e STZ SAL ($0,48 \pm 0,1$) e também entre os grupos CTL SAL e CTL EXT. Em relação à expressão de mRNA do gene Gys1, não houve diferença na expressão do mesmo entre o grupo STZ SAL ($0,11 \pm 0,04$) em relação à CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,36$ e $0,64 \pm 0,28$). A expressão do mesmo gene

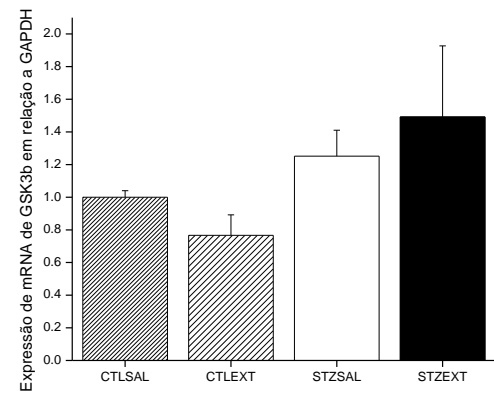
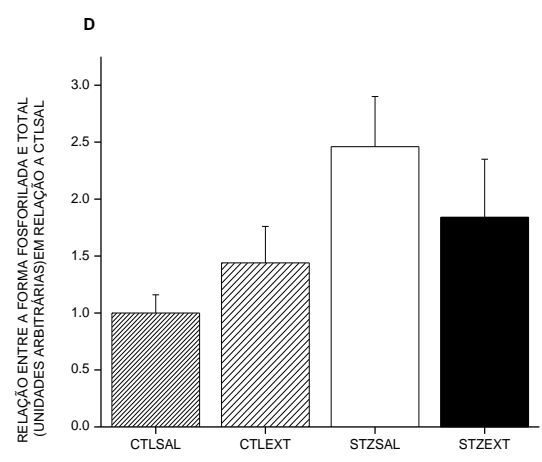
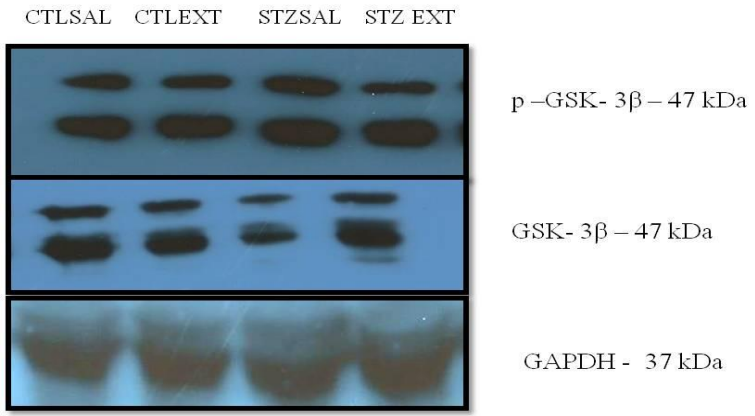
esteve diminuída no grupo STZ EXT ($0,06 \pm 0,01$) em relação à CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,36$ e $0,64 \pm 0,28$), (Fig. 7 E, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão de mRNA entre os grupos STZ SAL ($0,11 \pm 0,04$) e STZ EXT ($0,06 \pm 0,01$). Também não houve diferença entre os grupos CTL SAL e CTL EXT.





CTLSAL CTLEXT STZSAL STZ EXT





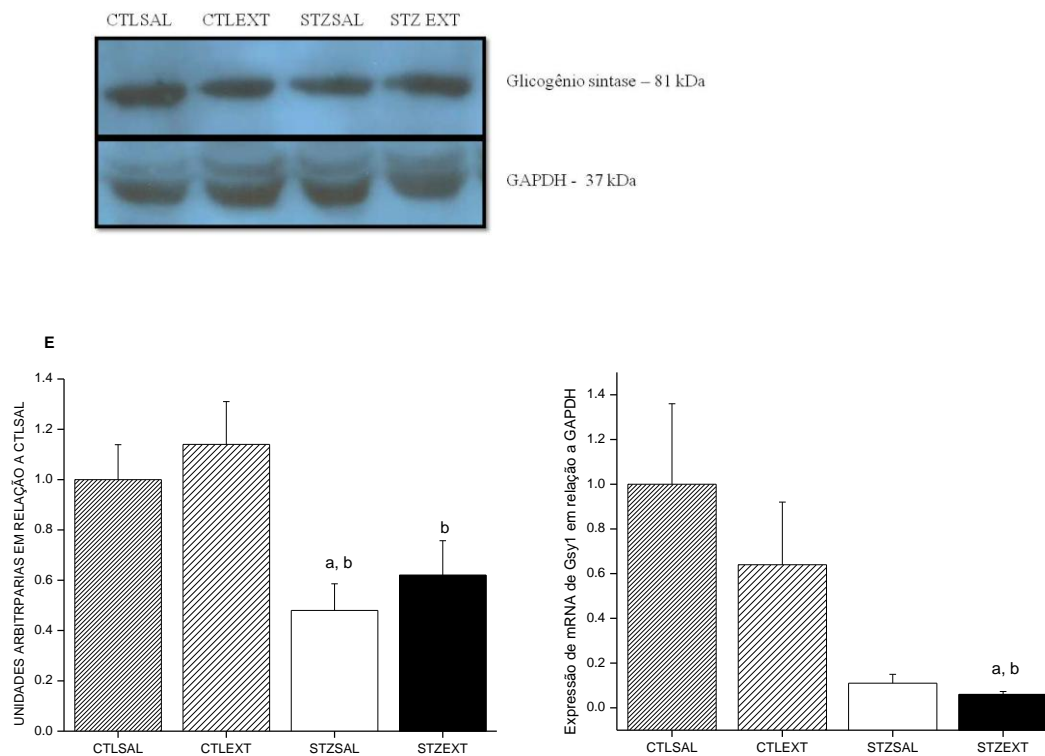


Figura 7 – Expressões proteica e de mRNA de PI3-k (A), AKT (B), GLUT 4(C), GSK-3 β (D) e glicogênio sintase (E) em músculo esquelético de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT) em relação à GAPDH. Os resultados indicam a relação entre as formas fosforilada e total. a vs. CTL SAL, b vs. CTL EXT, c vs. STZ SAL, $p < 0.05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test* de *Newman-Keuls*.

4.3 - Análise da expressão das proteínas PI3-K, AKT e GLUT4 nas formas total e fosforilada em gordura retroperitoneal de camundongos normoglicêmicos e diabéticos

A figura 8 A representa a relação entre a expressão da proteína PI3-K na sua forma fosforilada sob sua forma total. Observamos diminuição na expressão da proteína PI3-K nos grupos STZ SAL e STZ EXT ($0,49 \pm 0,04$ e $0,52 \pm 0,03$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,13$ e $1,07 \pm 0,07$), (Fig. 8 A, $p < 0.05$). Não houve

diferença na expressão da mesma entre os grupos STZ EXT ($0,52 \pm 0,03$) em relação à STZ SAL ($0,49 \pm 0,04$). Também não houve diferença entre os grupos CTL SAL E CTL EXT.

A figura 8 B representa a relação entre a expressão da proteína AKT na sua forma fosforilada sob sua forma total. Ocorreu diminuição na expressão da proteína AKT em ambos os grupos STZ SAL e STZ EXT ($0,54 \pm 0,02$ e $0,49 \pm 0,02$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,09$ e $1,04 \pm 0,08$), (Fig. 8 B, $p < 0,05$). Não houve diferença na expressão da mesma em relação aos grupos STZ EXT ($0,49 \pm 0,04$) e STZ SAL ($0,54 \pm 0,02$). Não houve diferença também na expressão entre os grupos CTL SAL E CTL EXT.

Em relação à expressão de GLUT4, ocorreu diminuição na expressão da mesma no grupo STZ SAL ($0,53 \pm 0,06$) em relação aos grupos CTL SAL e CTL EXT ($1 \pm 0,09$ e $1 \pm 0,10$), (Fig. 8 C, $p < 0,05$). O tratamento com extrato bruto de *M. bella* promoveu aumento na expressão da proteína GLUT4 nos camundongos do grupo STZ EXT ($0,97 \pm 0,14$) em relação ao grupo STZ SAL ($0,53 \pm 0,06$), (Fig. 8 C, $p < 0,05$). Não ocorreu diferença na expressão da mesma entre os grupos CTL SAL E CTL EXT.

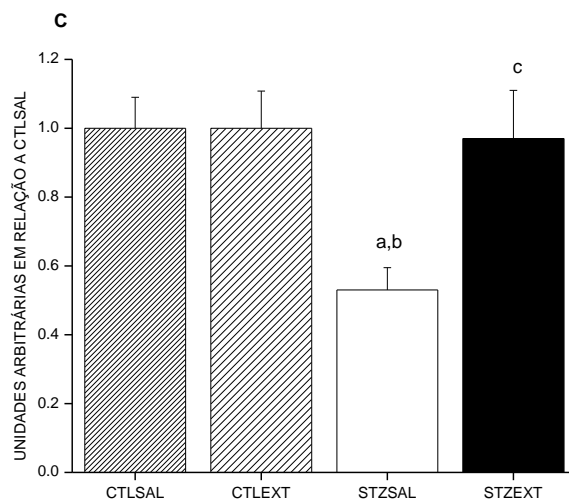
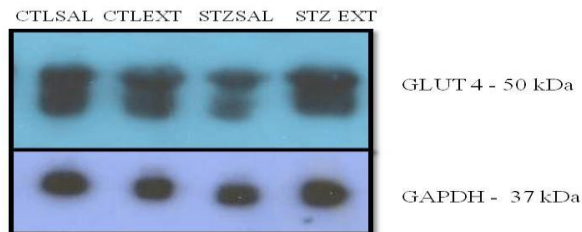
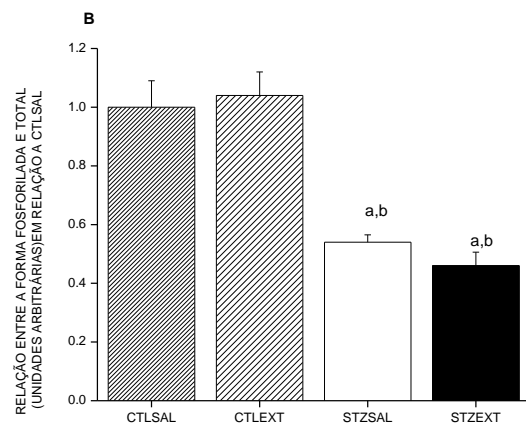
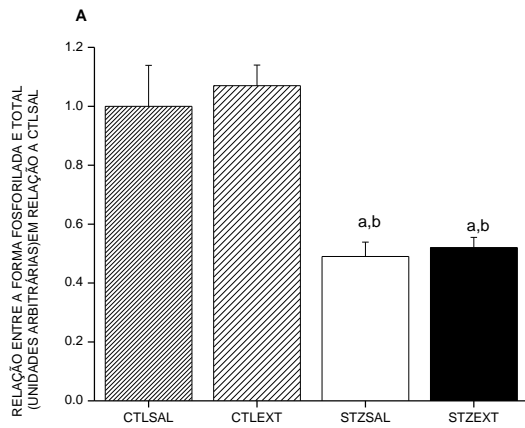
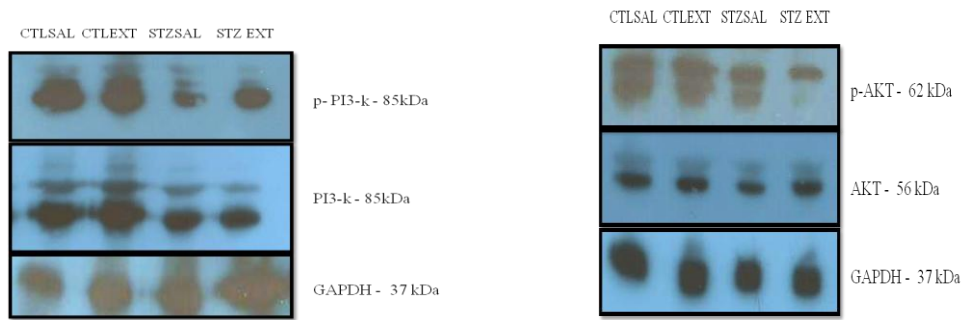


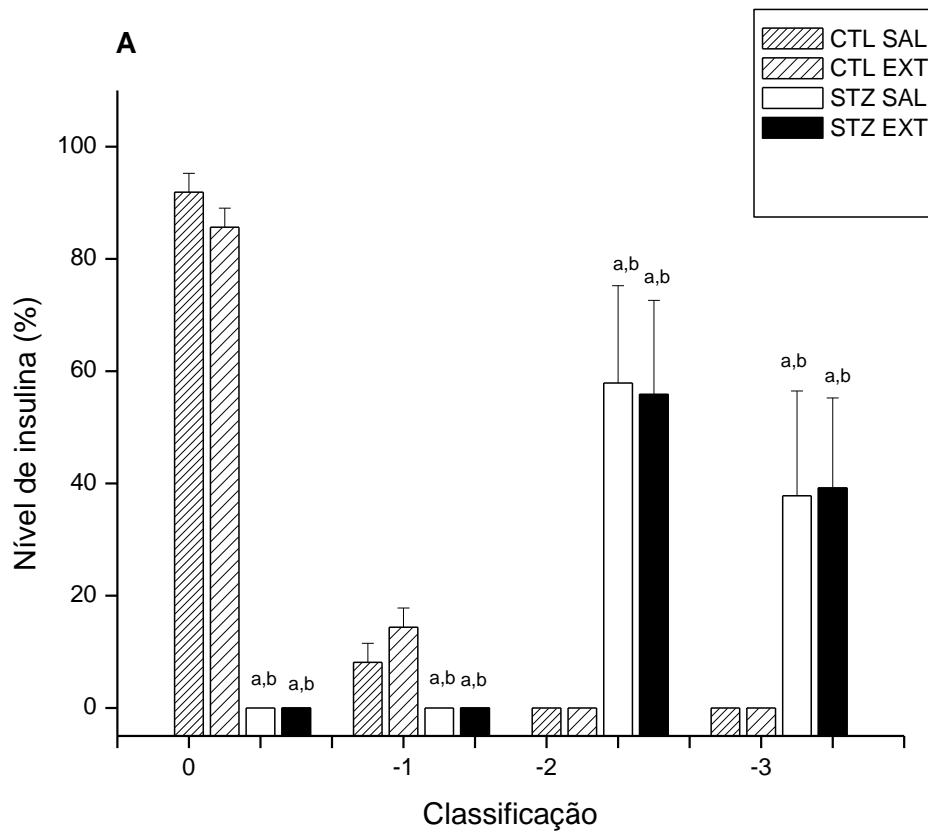
Figura 8– Expressão das proteínas PI3-K (A), AKT (B) e GLUT 4(C), em tecido adiposo branco retroperitoneal de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT) em relação à GAPDH. Os resultados indicam a relação entre as formas fosforilada e total. a vs. CTL SAL, b vs. CTL EXT, c vs. STZ SAL, $p < 0.05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test* de *Newman-Keuls*.

4.4 Análises imunohistoquímicas semi-quantitativas para detecção de insulina em pâncreas de camundongos normoglicêmicos e diabéticos

Em relação à marcação de insulina na ilhota, os níveis da mesma foram considerados segundo classificação da Tabela 2, que foi realizada considerando como 0 a marcação mais forte do grupo controle normoglicêmico CTL SAL. Os níveis de insulina foram classificados em ordem decrescente em comparação à CTL SAL (-1: um nível abaixo do nível normal, -2: dois níveis abaixo do nível normal e -3: inexistente). Camundongos diabéticos dos grupos STZ SAL e STZ EXT não apresentaram detecção de insulina nos níveis 0 e -1 (nível normal e 1 nível abaixo do normal) ($0 \pm 0\%$) comparada aos grupos controles normoglicêmicos CTL SAL ($91,87 \pm 3,37\%$ e $8,13 \pm 3,38\%$) e CTL EXT ($85,62 \pm 3,4\%$ e $14,37 \pm 3,4\%$), respectivamente, (Fig. 9 A e B, $p < 0.05$). Camundongos normoglicêmicos não apresentaram detecção nos níveis -2 e -3 (2 níveis abaixo do normal e inexistente) ($0 \pm 0\%$) em relação à STZ SAL ($57,88 \pm 17,36\%$ e $37,78 \pm 16,6\%$) e STZ EXT ($55,83 \pm 16,7\%$ e $39,16 \pm 16,06\%$), (Fig. 9 A e B, $p < 0.05$). Não houve diferença no conteúdo de insulina no pâncreas de camundongos diabéticos STZ SAL nos níveis -2 e -3 (2 níveis abaixo do normal e inexistente) ($57,88 \pm 17,36\%$ e $37,78 \pm 16,6\%$) e STZ EXT ($55,83 \pm 16,7\%$ e $39,16 \pm 16,06\%$), (Fig. 9 A e B). Também não houve diferença entre os grupos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT.

Tabela 2 – Classificação semi-quantitativa dos níveis de insulina em lâmina de pâncreas de camundongos

Nível de insulina	Classificação
-3	Inexistente
-2	Dois níveis abaixo do nível normal
-1	Um nível abaixo do nível normal
0	Nível normal



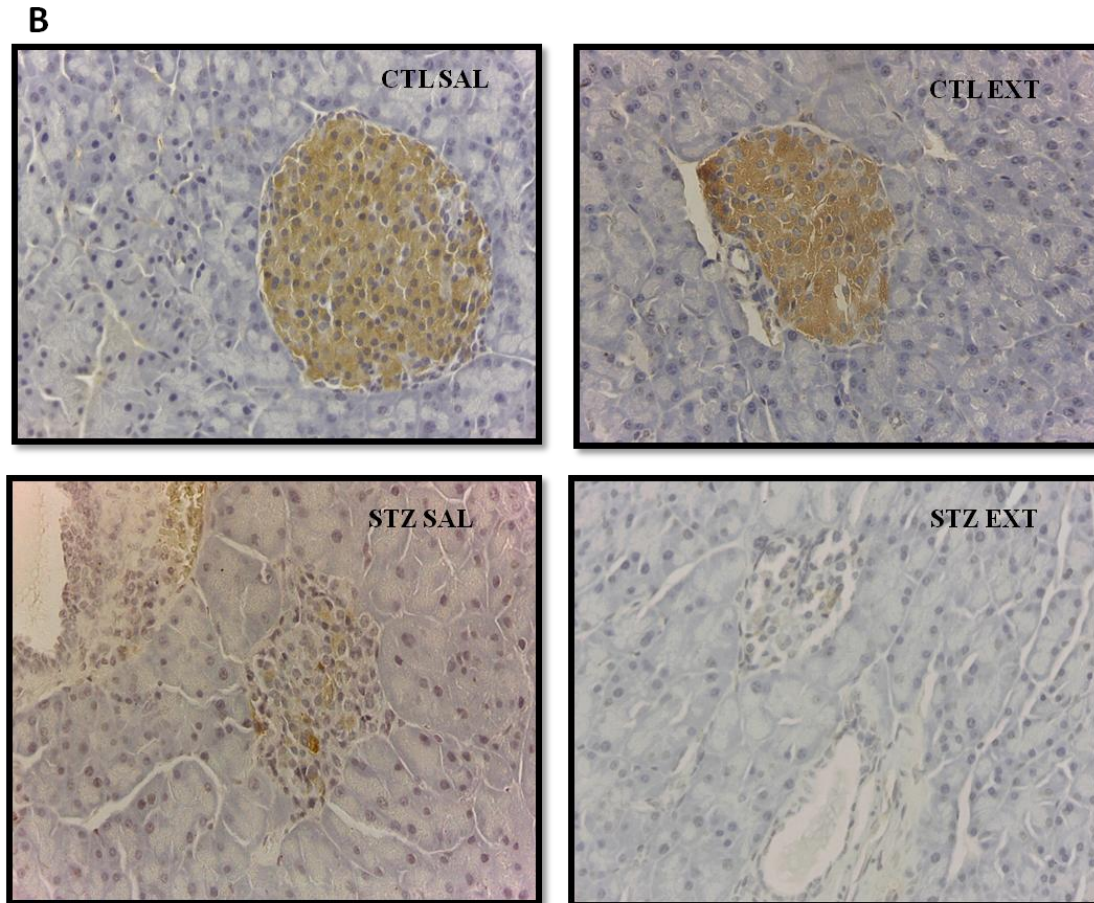


Figura 9 – Nível de insulina (%) (A) e ilhotas coradas com insulina (B) (x 400) no pâncreas de camundongos controle normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na concentração de 600 mg/kg (CTL EXT e STZ EXT). a vs. CTL SAL, b vs. CTL EXT. $p < 0.05$, $n = 5$. ANOVA seguido de *post test* de Newman-Keuls.

4.5 Ensaio enzimático *in vitro* para inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase e determinação de IC_{50}

O teste *in vitro* para avaliação da atividade da enzima alfa glicosidase na presença de diferentes concentrações do extrato bruto de *M. bella* mostrou o maior percentual de inibição na concentração de 19,5 $\mu\text{g/ml}$ do extrato, inibindo 99,90% da sua atividade enzimática. (Fig. 10 A). O IC_{50} da enzima alfa glicosidase na presença do extrato foi de 7,17 $\mu\text{g/ml}$ enquanto do controle positivo acarbose foi de 516,1 $\mu\text{g/ml}$

(Tabela 3). Em relação à enzima alfa amilase, o maior porcentual de inibição ocorreu na concentração de 312,5 µg/ml do extrato, inibindo 97,73% da sua atividade enzimática (Fig. 10 B). O IC_{50} do ensaio com alfa amilase na presença do extrato foi de 16,93 µg/ml enquanto o da acarbose de 2,7 µg/ml (Tabela 3).

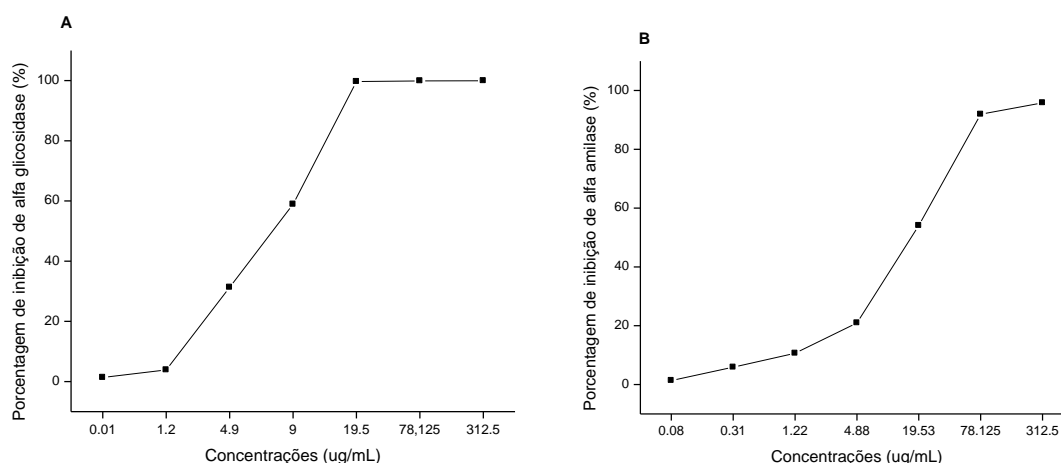


Figura 10 – Porcentagem de inibição de alfa glicosidase (A) e alfa amilase (B) em diferentes concentrações do extrato bruto de *Myrcia bella* *in vitro* em função de diferentes concentrações.

Tabela 3 – Valores de IC_{50} para as enzimas alfa glicosidase e alfa amilase na presença do extrato bruto de *Myrcia bella* e acarbose.

	Alfa glicosidase	Alfa amilase
Extrato bruto de <i>M. bella</i>	7,17µg/ml	16,93µg/ml
Acarbose (controle positivo)	516,1µg/ml	2,7µg/ml

4.6 Avaliação *in vivo* da inibição das enzimas alfa glicosidase e alfa amilase

A partir dos resultados obtidos *in vitro*, foram realizados ensaio *in vivo* para confirmação dos primeiros. Camundongos tratados com *M. bella* (MB) e com acarbose (AC) apresentaram glicemia significativamente menos após 30 minutos da administração de solução de maltose ($182,71 \pm 5,9$ mg/dl e $180,1 \pm 5,11$ mg/dl) quando comparados com os camundongos que receberam salina (CTL SAL) ($287,25 \pm 3,89$ mg/dl), (Fig. 11 A, $p < 0.05$). Após 60 minutos da administração de maltose, a glicemia dos camundongos do grupo MB foi menor ($145,57 \pm 4,68$ mg/dl) comparada ao grupo CTLSAL ($168,8 \pm 4,97$ mg/dL) e AC ($168,12 \pm 6,8$ mg/dl), (Fig. 11 A, $p < 0.05$). Em relação aos camundongos tratados com solução de amido, após 30 minutos, o valor da glicemia dos camundongos dos grupos MB e AC foi menor ($147,7 \pm 6,52$ e $142,5 \pm 5,77$) comparada aos camundongos CTL SAL ($172,3 \pm 9,7$), (Fig. 11 B, $p < 0.05$). No entanto, após 120 minutos, a glicemia dos camundongos de ambos os grupos MB e AC permaneceu maior ($119 \pm 1,89$ e $122,2 \pm 5,43$) comparada aos camundongos do grupo CTL SAL ($103,2 \pm 3,89$), (Fig. 11 B, $p < 0.05$). A área sob a curva mostra que ambos os grupos tratados com extrato e acarbose apresentaram menor área quando comparado ao grupo que recebeu salina em ambos os experimentos com amido e maltose (Fig. 11 A e B, $p < 0.05$).

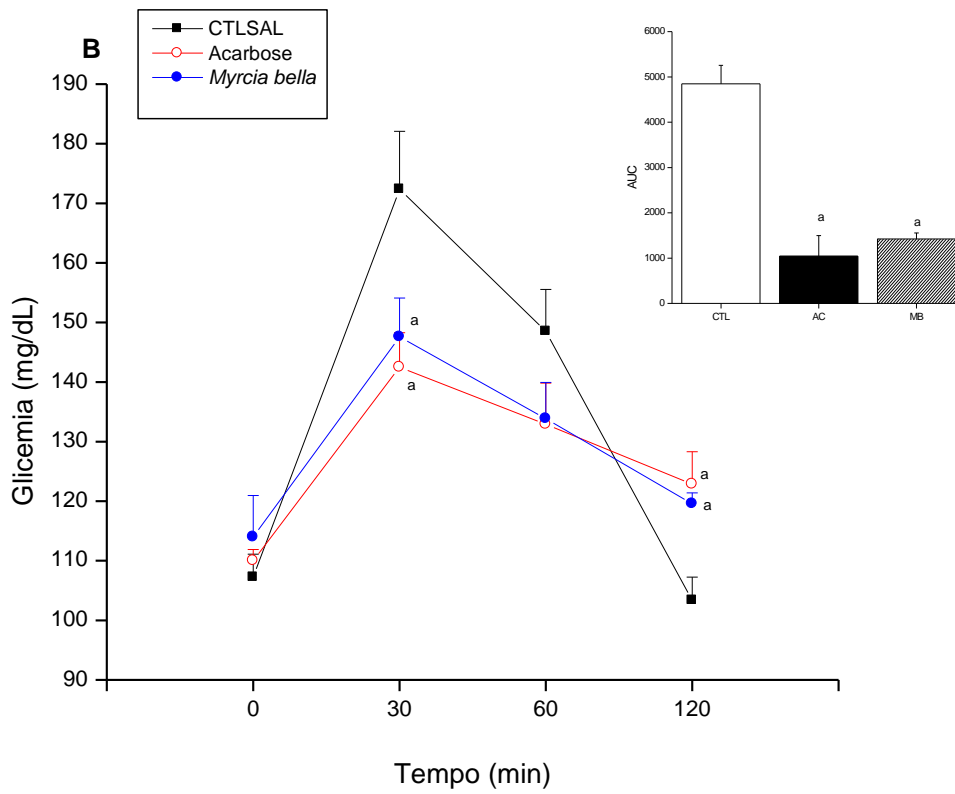
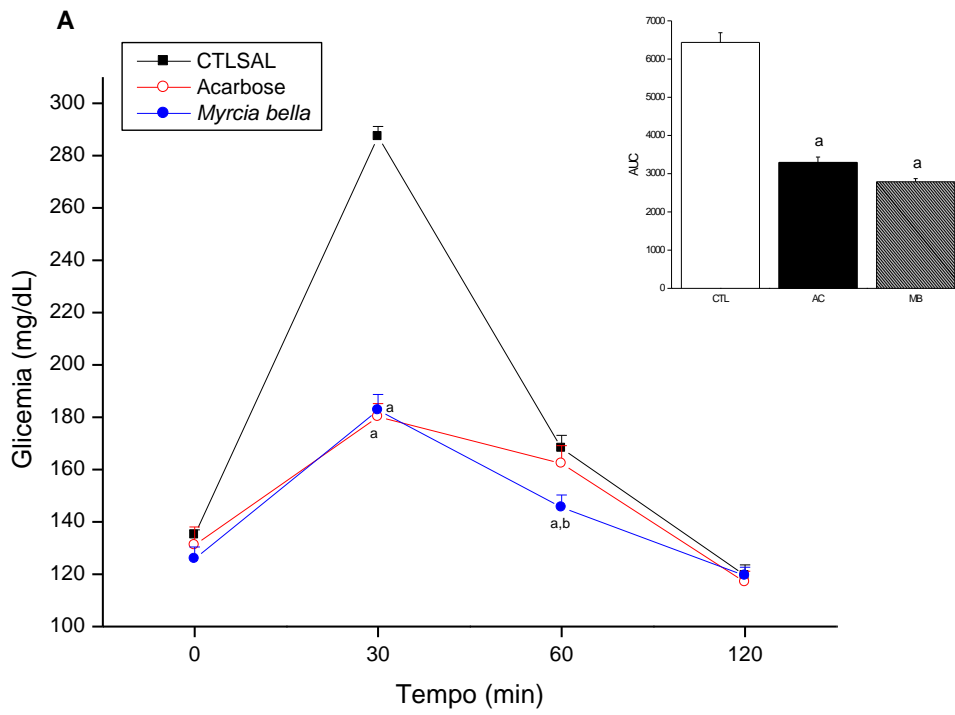


Figura 11 - Glicemia de camundongos normoglicêmicos tratados com salina (CTL SAL), extrato bruto de *Myrcia bella* (MB) 600 mg/kg ou acarbose (controle positivo) (AC) 10 mg/kg após ingestão oral de solução de maltose (**A**) ou amido (**B**) na dose de 2 g/kg e área sob a curva. a vs. CTL SAL, b vs. AC, $p < 0.05$, n=8. ANOVA seguido de *post test* de *Newman-Keuls*.

5. Discussão

As análises apresentadas no presente trabalho tiveram o objetivo de elucidar os possíveis mecanismos de ação do extrato em tecidos periféricos uma vez que, resultados obtidos durante o mestrado da aluna, mostraram que o mesmo extrato apresentou promissora atividade hipoglicemiante com melhora do quadro diabético de camundongos. A atividade hipoglicemiante anteriormente encontrada foi parcialmente explicada pelo aumento da expressão das principais proteínas da via de sinalização insulínica em fígado de camundongos tratados com o extrato bruto de *M. bella*, mostrando que o extrato estaria, possivelmente, agindo em nível molecular, abrindo-nos, portanto, a possibilidade de uma investigação mais aprofundada de sua ação. Além da investigação dos mecanismos de ação do extrato em tecidos periféricos, nos preocupamos em analisar o efeito do extrato sobre a secreção de insulina no pâncreas dos camundongos, além de investigar outra via de ação hipoglicemiante do extrato através da inibição de enzimas responsáveis pela absorção de glicose intestinal pelo mesmo.

A insulina controla o metabolismo glicêmico através da regulação da absorção e consumo de glicose pelos principais órgãos-alvo, tais como fígado, músculo esquelético, rins e tecido adiposo. Tal regulação é realizada através do controle das ações de várias enzimas metabólicas. Esse hormônio reduz a concentração de glicose plasmática através da regulação do metabolismo da glicose hepática pelos processos de glicógenólise, neoglicogênese e glicogênese (PESSIN e SALTIEL, 2000; WHITEMAN, CHO, BIRNBAUM, 2002). A regulação da síntese de glicogênio e a quebra do mesmo são essenciais para a homeostase glicêmica (PEDERSON et al., 2005). O conteúdo de glicogênio, a atividade da proteína glicogênio sintase e a resposta à sinalização da insulina estão reduzidos no diabetes (THORBURN et al., 1991). A

partir dos resultados obtidos, podemos observar redução na expressão da enzima glicogênio sintase no fígado dos camundongos diabéticos STZ SAL em relação aos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT. Camundongos diabéticos STZ EXT apresentaram aumento na expressão da mesma quando comparados à STZ SAL (Fig.6 A), revelando uma possível ação do extrato sobre o processo de glicogênese. Resultados anteriores obtidos por nosso grupo de pesquisa demonstraram aumento na fosforilação de algumas proteínas da via PI3-K/AKT em fígado, como IRS1, PI3-K e AKT. Dentre essas proteínas, a AKT, uma vez ativa pela ação do extrato, pode ter agido na ativação da proteína glicogênio sintase, aumentando, portanto, o conteúdo do glicogênio hepático e contribuindo para diminuição da glicose plasmática. A insulina desempenha um importante papel na regulação da expressão de genes hepáticos pelo controle em nível transcricional e/ou pós transcricional. A taxa de degradação do mRNA tem importante função no controle do nível da expressão de um gene e, sabe-se que as estabilidades de muitos mRNA são alteradas em resposta a uma variedade de parâmetros fisiológicos e estímulos farmacológicos (O'BRIEN e GRANNER, 1991). Observamos aumento na expressão de mRNA do gene que codifica a glicogênio sintase nos camundongos diabéticos STZ SAL em relação à CTL SAL e CTL EXT. Os camundongos diabéticos STZ EXT apresentaram, no entanto, menor expressão de mRNA do gene Gsy2 em relação aos diabéticos STZ SAL (Fig. 6 A). Uma vez que no nosso modelo de diabetes há diminuição dos níveis de insulina circulante, esperar-se ia que a expressão de mRNA dos camundongos diabéticos estivesse diminuída em relação aos controle normoglicêmicos, já que a insulina é a responsável por controlar a expressão de tal gene. No entanto, é possível o mRNA tenham sofrido influência de outros fatores que desconhecemos, causando uma super expressão do gene Gsy2 no grupo STZ SAL. Gannon e Nuttall (1997) também encontraram resultados discrepantes de atividade,

expressão proteica e de mRNA da glicogênio sintase. Esses autores, após experimentos com ratos normoglicêmicos e diabéticos, demonstraram que há alguns fatores que influenciam na atividade e na instabilidade do mRNA que codifica a glicogênio sintase. Concluíram, portanto, que o jejum o estado alimentado são os principais fatores que influenciam na síntese de mRNA, independente da atividade ou expressão proteica da glicogênio sintase tanto em ratos normoglicêmicos quanto diabéticos. Em nossos resultados, notamos que a maior expressão no gene não causou aumento na sua expressão proteica. Portanto, a análise dos dados de expressão proteica mostram-nos, mais seguramente, que houve diminuição na sua expressão em ambos os grupos diabéticos e também alteração da expressão da glicogênio sintase provocada pelo tratamento com o extrato. O aumento da expressão da proteína glicogênio sintase associado ao aumento no conteúdo de glicogênio no fígado e diminuição da glicemia de jejum nos camundongos diabéticos previamente reportados, pode estar associado à melhora no processo de glicogênese promovido pelo tratamento com o extrato e consequente diminuição da glicemia também já reportada anteriormente.

Sabe-se que o processo de neoglicogênese está aumentado no estado diabético, contribuindo também para o desenvolvimento da hiperglicemia (CLINE et al., 1994; VELHO et al., 1996). Na ausência de insulina, tecidos neoglicogênicos como rins e fígado, convertem lactato e outras moléculas que não são carboidratos em glicose que é então liberada para a circulação. Uma enzima importante envolvida no metabolismo de carboidratos em mamíferos é a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), responsável pelo controle da neoglicogênese e da produção de glicose pelo fígado (MATTE et al., 1997) por estar envolvida na síntese de glicose-6-fosfato a partir de precursores não-carboidratos. Os camundongos diabéticos STZ SAL apresentaram aumento na

expressão da proteína PEPCK em comparação aos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT (Fig. 6 B), aumento este, característico do quadro diabético. O extrato de *M. bella*, no entanto, promoveu diminuição na expressão da PEPCK no grupo dos camundongos diabéticos STZ EXT. Tal resultado mostra-se interessante, uma vez que, o extrato parece agir não somente no processo de glicogênese, mas também na inibição no processo de neoglicogênese, contribuindo, portanto, para redução na formação de glicose-6-fosfato e conseqüente diminuição da glicemia de jejum dos camundongos diabéticos. A expressão do gene *Pck1* que codifica a PEPCK é influenciada por diversos fatores, como cAMP, hormônios glicocorticoides, insulina, entre outros (HANSON e RESHET, 1998). A insulina age como inibidora da transcrição do mesmo em células hepáticas. Qualquer mutação que eleve a transcrição do gene *Pck1*, deve ocasionar aumento na atividade enzimática da PEPCK, o que, por conseqüência, ocasionaria aumento na concentração da glicose sanguínea através de seu efeito sobre a neoglicogênese (VIDNES e SOVIK, 1976). Como observado em nosso estudo, os camundongos diabéticos dos grupos STZ SAL e STZ EXT apresentaram aumento na expressão de mRNA do gene *Pck1* comparados aos grupos CTL SAL e CTL EXT. O tratamento com extrato de *M. bella* promoveu diminuição na expressão de mRNA do gene codificador de PEPCK em camundongos diabéticos STZ EXT quando comparados à STZ SAL (Fig. 6 B). Tais resultados corroboram os resultados da expressão da proteína PEPCK, que também se mostrou diminuída em camundongos diabéticos tratados com o extrato. A importância da PEPCK no metabolismo de carboidratos em seres humanos advém do fato que a mesma tem potencial para ser utilizada como alvo de drogas para o tratamento do diabetes, uma vez que contribui para a diminuição da glicemia (MATTE et al., 1997). Por meio dos resultados obtidos, podemos inferir que o

extrato utilizado nesse trabalho parece modular o processo de neoglicogênese em nível molecular, agindo, portanto, na redução da glicemia.

Uma das enzimas chave na regulação da glicose sanguínea e que participa das etapas finais da neoglicogênese e da glicogenólise é a glicose-6-fosfatase (KUROSAKI et al., 2003). O último passo na produção de glicose hepática através dos processos acima citados é catalisado pelo sistema microsomal glicose-6-fosfatase (VAN DE WERVE et al., 2000). Esta enzima hidroliza a glicose-6-fosfato à glicose que é, então, liberada na corrente sanguínea (TRINH et al., 1998). Nossos resultados demonstraram aumento na expressão da enzima glicose-6-fosfatase nos animais do grupo diabético STZ SAL em relação aos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT. O tratamento com o extrato de *M. bella* promoveu diminuição na expressão desta enzima nos camundongos STZ EXT quando comparado à STZ SAL (Fig. 6 C). O tratamento com extrato parece modular os processos que liberam glicose para circulação, contribuindo, portanto, para a diminuição glicêmica anteriormente observada. A atividade e os níveis de mRNA da subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase estão aumentados na presença de glicose, ácidos graxos livres, glicocorticoides e glucagon, enquanto a insulina inibe a expressão gênica da mesma (FOSTER, PEDERSON, NORDLIE, 1997). Os camundongos diabéticos STZ SAL apresentaram aumento na expressão de mRNA do gene G6PC em relação ao grupos CTL SAL e CTL EXT. O tratamento com extrato bruto de *M. bella* promoveu diminuição na expressão do mRNA nos camundongos STZ EXT quando comparado aos camundongos diabéticos STZ SAL (Fig.6 C). Tais resultados estão de acordo com os resultados já expostos da expressão proteica da glicose-6-fosfatase nos mesmos grupos experimentais. A redução na expressão de mRNA dos genes que codificam as enzimas glicose-6-fosfatase e PEPCK,

assim como a redução na expressão das mesmas através do tratamento com extrato de *M. bella*, nos leva a acreditar que o extrato age também na redução dos processos que liberam glicose para a corrente sanguínea em um estado diabético. Liu et al. (2017) demonstraram que a administração do extrato do fruto da espécie *Eugenia jambolana* enriquecido de triterpenoides, pertencente a mesma família da planta estudada nesse trabalho, apresentou inibição da neoglicogênese hepática através da diminuição dos genes codificadores da PEPCK e glicose-6-fosfatase. Prasad et al. (2005) também demonstraram que o extrato da espécie *Syzygium aromaticum*, também pertencente a família Myrtaceae, diminuiu a expressão dos mesmos genes envolvidos na neoglicogênese em hepatócitos. Nossos resultados, em adicional aos resultados anteriores obtidos de diminuição glicêmica, aumento do conteúdo de glicogênio e das proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica no fígado dos camundongos diabéticos, parecem elucidar, em parte, os possíveis mecanismos de ação hipoglicemiante do extrato. Portanto, a partir dos resultados agora descritos, e em conjunto com os resultados anteriormente citados, acreditamos que o extrato bruto de *M. bella* parece agir sobre o metabolismo glicêmico, atuando sobre a expressão das principais enzimas reguladoras da homeostase glicêmica em fígado, o que contribui para a atividade hipoglicêmica anteriormente encontrada.

O músculo esquelético representa aproximadamente 40% da massa corporal total e exerce importante papel no metabolismo da glicose (SMITH e MUSCAT, 2005). É responsável por aproximadamente 30% do consumo energético, além de ser um dos principais tecidos, juntamente com o fígado, responsáveis pela captação e estocagem da glicose (NUUTILA et al., 1992). A insulina aumenta o transporte de glicose para as células musculares e adipócitos através da translocação das vesículas contendo

transportadores de glicose do tipo GLUT 4 do citoplasma para a membrana plasmática (SALTIEL e KAHN, 2001). Como observado em nossos resultados, os camundongos diabéticos do grupo STZ SAL apresentaram diminuição na expressão das proteínas PI3-K e AKT e do transportador de glicose GLUT4 em relação aos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT (Fig. 7A, B, C). O tratamento com extrato bruto de *M. bella* não demonstrou efeito sobre a expressão de tais proteínas no grupo dos camundongos diabéticos STZ EXT em relação à STZ SAL, uma vez que não houve diferença estatística na expressão de PI3-K, AKT e GLUT 4 entre os grupos (Fig. 7A, B, C). O diabetes, tanto o tipo 1 quanto o 2, é caracterizado pela perda da ação da insulina sobre os músculos esqueléticos, o que leva a mudanças no metabolismo de glicose e de lipídios, na expressão gênica e fosforilação de proteínas (SALTIEL e KAHN, 2001). Em relação à expressão de mRNA, interessante, notamos aumento na expressão do gene *Pik3r1*, que codifica a proteína PI3-K, em camundongos diabéticos STZ SAL e STZ EXT em comparação à CTL SAL e CTL EXT, sendo a expressão do grupo STZ EXT estatisticamente superior ao grupo STZ SAL (Fig.7 A). A análise da expressão das proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica em músculo esquelético, assim como outros resultados já expostos, não nos deixa dúvidas que nosso modelo de diabetes tipo 1 é bem estabelecido, haja vista a diminuição na expressão das mesmas nos camundongos diabéticos. No entanto, é possível que outros fatores estejam influenciando na expressão de mRNA do referido gene. É importante ressaltar, porém, que o aumento na transcrição do gene *Pik3r1* não causou aumento na tradução da proteína PI3-K em ambos os grupos diabéticos indicando que a fosforilação das proteínas da via continua sendo nosso principal indicador da atividade do extrato. Em relação à expressão de mRNA do gene *AKt1*, responsável por codificar a proteína AKT, notamos que o tratamento com extrato promoveu aumento na expressão do

mesmo no grupo diabético STZ EXT quando comparados à STZ SAL (Fig. 7 B). Analisando os resultados da expressão proteica de AKT, não observamos diferença estatística na expressão da proteína entre os grupos dos camundongos diabéticos STZ EXT e STZ SAL. A partir de tais resultados podemos inferir que o extrato bruto de *M. bella* foi capaz de modular a expressão de mRNA de AKt1, no entanto, não foi suficiente para modular a expressão da respectiva proteína. Já a análise da expressão do gene Slc2a4, que codifica a proteína GLUT4 mostrou que os camundongos diabéticos STZ SAL apresentaram menor expressão em comparação a CTL SAL.(Fig. 7C). No entanto, não encontramos diferenças entre STZ EXT e CTL SAL ou CTL EXT, como observada nos resultados de expressão proteica. Através dos resultados das expressões gênica e proteica em músculo esquelético, concluímos, portanto, que o extrato parece não modular a via de sinalização insulínica nesse tecido uma vez que não encontramos alterações nas expressões das mesmas de camundongos diabéticos tratados com o extrato de *M. bella*. O tratamento com o mesmo não mostrou efeito na expressão de genes e proteínas envolvidas na captação de glicose em músculo esquelético dos camundongos diabéticos STZ EXT em relação à STZ SAL, com exceção dos genes que codificam as proteínas PI3-k e AKT, Pik3r1 e Akt1, respectivamente. No entanto, uma vez que não houve diferença na expressão das respectivas proteínas, não podemos afirmar que o tratamento modulou a expressão das mesmas, mesmo com aumento no mRNA dos genes correspondentes. A partir dos resultados obtidos acreditamos, portanto, que o extrato de *M. bella* parece não agir sob a sinalização e captação de glicose no músculo esquelético dos camundongos diabéticos, não sendo, portanto, o principal tecido envolvido na diminuição da glicemia de jejum previamente reportada.

A enzima GSK-3, envolvida no processo de glicogênese, é inibida pela ação da insulina através da fosforilação das proteínas da via PI3-K/AKT. A inativação da isoforma GSK-3 β parece ser a principal forma pela qual a insulina estimula a síntese de glicogênio (CROSS et al., 1997; MORA et al., 2005). Uma vez desfosforilada, a GSK-3 β promove ativação da enzima glicogênio sintase, levando então, à síntese de glicogênio (JENSEN et al., 2011). Não notamos diferença significativa nas expressões tanto proteica quanto gênicas nos grupos diabéticos STZ SAL e STZ EXT em relação aos normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT (Fig. 7 D). O aumento da expressão da enzima GSK-3 β está associado à diminuição na expressão da enzima glicogênio sintase. Apesar de não notarmos aumento significativo na expressão da primeira nos grupos diabéticos em relação aos normoglicêmicos, notamos diminuição na expressão da enzima glicogênio sintase no grupo STZ SAL em relação aos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT e também em STZ EXT em relação à CTL EXT. O tratamento com extrato de *M. bella* não aumentou a expressão da enzima em relação aos camundongos diabéticos STZ SAL (Fig.7 E). Os resultados da expressão gênica mostraram que houve diminuição na expressão de mRNA do gene *Gys1* em camundongos diabéticos STZ EXT quando comparados à CTL SAL e CTL EXT (Fig.7 E). O tratamento também não alterou a expressão de mRNA de camundongos diabéticos tratados com o extrato STZ EXT em comparação a STZ SAL. Resultados anteriores obtidos em nosso grupo demonstraram diminuição no conteúdo de glicogênio muscular dos camundongos diabéticos de ambos os grupos em relação aos controles normoglicêmicos. O tratamento realizado com extrato não promoveu aumento no conteúdo do glicogênio muscular no grupo STZ EXT (VAREDA et al, 2014). Uma vez que os resultados agora obtidos nos mostram que o extrato parece não agir sobre a expressão dos genes e proteínas que controlam a síntese de glicogênio em músculo

esquelético, acreditamos que os mesmos justificam o conteúdo diminuído de glicogênio nesse tecido nos camundongos diabéticos e o não restabelecimento do mesmo pelo tratamento. Desse modo, os resultados agora obtidos em músculo esquelético nos levam a acreditar que o extrato não age na captação e estoque de glicose nesse tecido em um estado diabético, não contribuindo, portanto, para a atividade hipoglicemiante previamente encontrada.

O tecido adiposo de mamíferos desempenha inúmeras funções para o organismo, incluindo isolamento, termogênese e produção de hormônios regulatórios. O adipócito possui a habilidade de estocar nutrientes e mobilizar sua reserva de energia quando necessário. A insulina é responsável pela translocação dos transportadores de glicose para a membrana plasmática no adipócito. A translocação do GLUT4 é regulada principalmente por duas vias, a via de sinalização de insulina e a via AMPK (HUANG e CZECH, 2007). Os resultados apresentados demonstraram diminuição na expressão das principais proteínas envolvidas na sinalização insulínica em tecido adiposo retroperitoneal, como PI3-K e AKT, nos camundongos diabéticos dos grupos STZ SAL e STZ EXT quando comparados aos grupos dos controles normoglicêmicos CTL SAL e CTL EXT (Fig. 8 A e B). O tratamento com extrato bruto de *M. bella* não alterou a expressão de tais proteínas no tecido adiposo dos camundongos diabéticos STZ EXT em relação à STZ SAL. Em relação à expressão do GLUT4, notamos que o tratamento com extrato de *M. bella* promoveu aumento na expressão do transportador quando comparado aos camundongos diabéticos STZ SAL (Fig. 8 C). O extrato parece promover aumento na expressão do GLUT 4 e consequente captação de glicose em tecido adiposo independentemente da via PI3-k/AKT. Uma vez que as principais proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina não foram alteradas pelo

tratamento com o extrato, é possível que o aumento na expressão do transportador GLUT4 possa estar relacionado com alterações de outras vias envolvidas no transporte do mesmo, como por exemplo, a via AMPK ou mesmo pela ativação direta das proteínas do complexo CAP/CBL/TC10 através da fosforilação do receptor de insulina. Sabe-se que a ativação da proteína AMPK é responsável por aumentar a translocação do transportador GLUT 4 em músculo esquelético (KAHN et al., 2005). Ainda há poucos estudos avaliando o potencial da proteína AMPK na captação de glicose em tecido adiposo. Alguns trabalhos publicados têm mostrado que a captação de glicose pelos adipócitos *in vitro* pode ocorrer de forma independente da via de sinalização insulínica (DAVAL, FOUFELLE, FERRÉ, 2006). Um estudo realizado com adipócitos primários de ratos demonstrou que a enzima adiponectina ativa a proteína AMPK e aumenta a captação de glicose pelas células adiposas através do aumento da expressão de GLUT 4. Tal estudo sugere um possível papel da AMPK no transporte de glicose em adipócitos, que poderia envolver um mecanismo diferente da via de sinalização de insulina (WU et al., 2003). Outra via relacionado ao transporte de glicose através da translocação do transportador GLUT4 é a via do complexo CAP/CBL/TC10. A ligação da insulina no seu receptor e, conseqüente fosforilação do mesmo, catalisa a fosforilação em resíduos de tirosina do proto – oncogene CBL. O mesmo está associado à proteína CAP, e, uma vez que o complexo é fosforilado, ativa a proteína TC10 que aumenta a translocação da proteína GLUT4 com conseqüente aumento de transporte de glicose para dentro da célula. O complexo CAP/CBL/TC10 parece formar uma segunda via de para ativação do transportador GLUT4 em paralelo à via PI3-k/AKT (SALTIEL e KAHN, 2001). Não podemos afirmar apenas através do nosso resultado de expressão do GLUT4 que o extrato modula a via AMPK ou a via CAP/CBL/TC10 uma vez que não foi possível mensurar a expressão de tais proteínas. No entanto, a partir dos resultados obtidos

podemos inferir que o extrato de *M. bella* contribui para a captação de glicose em tecido adiposo retroperitoneal através do aumento da translocação das vesículas contendo o transportador GLUT4, o que contribui para a diminuição da glicose plasmática. Portanto, o tecido adiposo, juntamente com o tecido hepático, parece contribuir para a diminuição da glicemia de camundongos diabéticos através do tratamento com o extrato bruto de *M. bella*.

Sabe-se que um dos mecanismos de ação das plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes é o aumento da secreção de insulina no pâncreas (TANIRA, 1994). A fim de elucidar mais um mecanismo de ação do extrato bruto das folhas de *M. bella*, buscamos avaliar a influência do mesmo na secreção de insulina pelo pâncreas de camundongos diabéticos. As análises realizadas por imunohistoquímica demonstraram que o tratamento com o extrato não foi capaz de aumentar a secreção de insulina nas células beta restantes das ilhotas dos camundongos diabéticos STZ EXT comparado à STZ SAL (Fig. 9 A e B). No entanto, análises mais profundas de quantificação de insulina e de células beta são necessárias. Resultados anteriores obtidos em nosso grupo demonstraram que o tratamento com o extrato não foi capaz de aumentar a insulinemia basal no soro de camundongos diabéticos STZ EXT em relação à STZ SAL (VAREDA et al., 2014). Tais resultados estão de acordo com os resultados aqui descritos. A partir de tais podemos previamente concluir que o tratamento com o extrato de *M. bella* não age no aumento da secreção de insulina no pâncreas de camundongos diabéticos. A ação hipoglicemiante do extrato, visto resultados acima apresentados neste trabalho e os abaixo descritos se deve, possivelmente, à sua ação extra pancreática.

Atualmente, há uma grande quantidade de trabalhos que identificam plantas ou compostos utilizados na inibição de enzimas intestinais como alfa amilase e alfa glicosidase, uma vez que, a inibição das mesmas, seria responsável pela diminuição da glicemia após uma refeição rica em carboidratos. As amilases, de um modo geral, são enzimas da família de endoamilases que catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4- do amido, formando unidades menores de oligossacarídeos como produtos finais (WHITCOMB e LOWE, 2007). As enzimas alfa glicosidases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 de dissacarídeos ou oligossacarídeos liberando unidades de glicose (OTA et al., 2009). Os inibidores dessas enzimas são encontrados em diversas espécies vegetais e há diversos compostos identificados como responsáveis por tal atividade. O extrato das folhas da espécie *Syzygium cumini* também conhecida como *Eugenia jambolana*, pertencente à família Myrtaceae, apresentou 98% de inibição da atividade da enzima alfa amilase (KARTHIC et al., 2008). Shinde et al. (2008) mostraram que o extrato das sementes da mesma espécie apresentou maior inibição da enzima alfa glicosidase quando comparado ao controle positivo acarbose. Já Arai et al. (1999) encontraram que o extrato etanólico das folhas de *Eugenia uniflora*, também pertencente à família Myrtaceae, apresentou 80% de inibição sobre a atividade da enzima alfa glicosidase. González-Figueiredo et al. (2016) mostraram que os extratos das espécies *Myrcia salicifolia*, *Myrcia sphaerocapa* e *Myrcia speciosa* apresentaram inibição da enzima alfa glicosidase de 90 a 500 vezes mais que o controle positivo acarbose, com IC_{50} variando entre 0,7 a 4,1 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o IC_{50} da acarbose foi de 356 $\mu\text{g/ml}$. Já a inibição da enzima alfa amilase foi mais moderada, apresentando valores de IC_{50} variando entre 6,1 e 29 $\mu\text{g/ml}$, valores estes maiores que o apresentado pela acarbose, de 1,4 $\mu\text{g/ml}$. Uma vez que a inibição de tais enzimas é de grande interesse na redução da absorção da glicose ingerida após uma refeição, e

consequentemente, redução da glicemia de pacientes diabéticos, buscamos avaliar a ação do extrato na possível inibição da atividade das enzimas citadas a fim de elucidar mais um mecanismo envolvido na atividade hipoglicemiante anteriormente obtida.

Nossos resultados demonstraram que o extrato bruto de *M. bella* apresentou percentual de inibição para a enzima alfa glicosidase de 99,90% na concentração de 19,5 µg/ml (Fig. 10 A) e menor valor de IC_{50} comparado à acarbose, apresentando, portanto, maior potencial inibitório quando comparado ao controle positivo (Tabela 3). Do mesmo modo, como já mencionado, três espécies de *Myrcia* apresentaram atividade inibitória para a mesma enzima muito superior ao controle positivo acarbose (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO et al. 2016). Já em relação à atividade da enzima alfa amilase, o extrato de *M. bella* apresentou percentual de inibição de 97,73% na maior concentração estudada, de 312,5 µg/ml (Fig. 10 B), no entanto, seu IC_{50} foi superior ao da acarbose (Tabela 3). Nossos resultados *in vitro* mostram, portanto, que o extrato foi mais eficaz na inibição da enzima alfa glicosidase comparado a acarbose e mostrou inibição moderada de alfa amilase. A pesquisa por plantas com atividade inibitória das enzimas descritas têm focado na descoberta de compostos que possuam alta inibição da enzima alfa glicosidase e com efeito moderado sobre a enzima alfa amilase (KWON et al., 2007; APOSTOLIDIS, KWON, SHETTY, 2007). A inibição simultânea de ambas as enzimas resultaria em fermentação bacteriana anormal no colo intestinal devido à presença de carboidratos não digeridos, que, por consequência, causariam efeitos adversos, como distensão abdominal, flatulências e diarreia (DALAR e KONECZACK, 2013). Nossos resultados estão, portanto, em acordo o esperado apresentado pela literatura e nos elucidam mais um mecanismos envolvido na atividade hipoglicemiante do extrato.

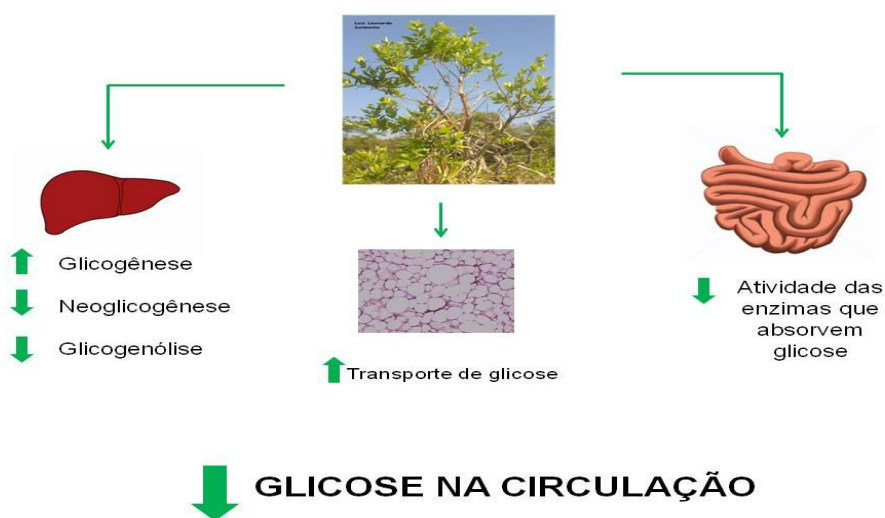
A fim de confirmar os resultados obtidos *in vitro*, foram realizados ensaios *in vivo* para verificação da glicemia pós prandial de camundongos normoglicêmicos tratados com o extrato e com controle positivo acarbose. Nos testes *in vivo* observamos que os camundongos tratados com o extrato antes da administração de amido ou maltose apresentaram menor glicemia após o pico de 30 minutos quando comparado àqueles que receberam salina. A glicemia dos camundongos tratados com extrato e que receberam maltose após 60 minutos também foi significativamente menor do que os que receberam salina e acarbose. A área sob a curva mostra que o extrato agiu na diminuição da glicemia pós prandial dos camundongos de maneira semelhante ao controle positivo acarbose em ambos os tratamentos (Fig. 11 A e B). A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que o extrato de *M. bella* apresenta atividade inibitória para as enzimas alfa amilase e alfa glicosidase, confirmando os resultados *in vitro*, contribuindo, portanto, para a diminuição glicêmica dos camundongos.

Sabe-se que a atividade dos extratos está relacionada a seus compostos químicos. Moléculas presentes em plantas podem apresentar potente inibição das enzimas alfa amilase (PIPARO et al., 2008) e alfa glicosidase (KUMAR et al., 2011). Tadera et al. (2006) testaram seis grupos de flavonoides na inibição da enzima alfa amilase e encontraram que os flavonoides dos grupos luteína, mirecetina e quercetina apresentaram potente inibição para a mesma enzima pancreática e que, o potencial inibitório está correlacionado com o número de grupos hidroxilas presentes no anel B do flavonoide. Diversos flavonoides e compostos fenólicos como ácido gálico também são descritos na literatura por apresentarem inibição da enzima alfa glicosidase (YIN et al., 2014). González-Figueiredo et al. (2016) determinaram o perfil químico de três espécies de *Myrcia*, *M. salicifolia*, *M. sphaerocapa* e *M. speciosa* e identificaram os

principais compostos envolvidos na inibição das enzimas alfa amilase e glicosidase como flavonoides do tipo quercetina e mirecetina e ácidos fenólicos como ácido gálico. Wubshet et al. (2015) encontraram diversos compostos na espécie *Myrcia palustri* que apresentaram atividade inibitória para a enzima alfa glicosidase, entre eles flavonoides do tipo mirecetina e quercetina. Saldanha et al. (2013) identificaram os compostos químicos da espécie *Myrcia bella*, sendo estes principalmente flavonoides derivados de quercetina e mirecetina e ácidos fenólicos como ácidos gálico. Uma vez que os constituintes químicos encontrados na espécie estudada neste trabalho são praticamente os mesmos encontrados nas plantas pertencentes ao gênero *Myrcia*, acreditamos que os mesmos constituintes sejam os principais responsáveis pela atividade inibitória das enzimas envolvidas na absorção de glicose intestinal. Tais resultados, juntamente com os previamente já descritos, elucidam, em partes, a atividade hipoglicemiante encontrada na espécie *Myrcia bella*, o que abre grandes portas para o futuro desenvolvimento, com mais confiabilidade, de um possível fitoterápico com atividade hipoglicemiante.

6. *Conclusão*

Os dados expostos nos levam a acreditar que o fígado seja o principal órgão responsável pela atividade hipoglicemiante e melhora no estado diabético observadas em nosso modelo através da modulação de genes e proteínas envolvidas no metabolismo de glicose pelo tratamento com o extrato de *M. bella*. Acreditamos no papel do tecido adiposo branco sobre a captação de glicose plasmática necessitando, portanto, de experimentos mais aprofundados envolvendo outras vias de sinalização. O extrato bruto de *M. bella* parece não influenciar na secreção de insulina no pâncreas, sendo a ação do extrato considerada, portanto, extra pancreática. Os estudos *in vitro* e *in vivo* a respeito da inibição das enzimas responsáveis pela absorção de glicose intestinal demonstraram que o extrato também age na redução glicêmica pós prandial através da inibição da alfa glicosidase e alfa amilase, ajudando, portanto, na diminuição glicêmica e do quadro diabético. Os resultados apresentados nos levam a acreditar, portanto, que o extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* é eficiente na diminuição da glicemia de camundongos diabéticos, agindo principalmente no metabolismo de glicose em fígado e através da inibição das enzimas intestinais e, tem potencial para ser futuramente padronizado e utilizado na forma de fitoterápico para o tratamento do diabetes em pacientes.



7. Referências

- ABDEL - HASSAN, I. A.; ABDEL - BARRY, J. A.; MOHAMMEDA, S. T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 325-330, 2000.
- AHMANDIAN, M.; DUNCAN, R. E.; JAWORSKI, K.; SARKADI-NAGY, E.; SUL, H. S. Triacilglycerol metabolism in adipose tissue. **Future Lipidol.**, n. 2, v. 2, 2007.
- ALVES, R. R. N.; SILVA, A. A. G.; SOUTO, W. M. S.; BARBOZA, R. R. D. Utilização e comercio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Rev. Bras. Farm.**, v.4, p. 175-198, 2007.
- APOSTOLIDIS, E.; KWON, Y. I.; SHETTY, K. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 8, p. 46-54, 2007.
- ARAI, L.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extract from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. **J Ethnopharmacol.**, v.14, n.68, p-307-314, 1999.
- ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE DIABETES. Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.S62-S69, 2011.
- BAE, S. S.; CHO, H.; MU, J.; BIRNBAUM, M. J. Isoform-specific regulation of insulin-dependent glucose uptake by Akt/protein kinase B. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 49530-49536, 2003.
- BAHARVAND-AHMADI, B.; BAHMANI, M.; TAJEDDINI, P.; NAGDHI, N.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. An ethno-medicinal study of medicinal plants used for the treatment of diabetes. **J Nephrothol.**, v. 5, p.44-50, 2016.
- BAVILONI, D. P.; SANTOS, M. P.; AIKO, G. M.; LIMA REIS, S. R.; LATORRACA, M. Q.; SILVA, V. C.; DALL'OGGIO, E. L.; SOUSA JUNIOR, P. T.; LOPES, C. F.; BAVIEIRA, A. M.; KAWAHITA, N. H. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae): Investigation in peripheral tissues. **J Ethnopharmacol.**, v. 131, p 135-139, 2010.
- BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes - utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.5, n.2, p.12-20, 2008.
- BRYANT, N. J., GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 3, p. 267-277, 2002.
- CHANG, L.; CHIANG, S. H.; SALTIEL, A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol. Med.**, v. 10, p. 65-71, 2004.
- CLINE, G.W.; ROTHMAN, D. L.; MAGNUSSON, I.; KATZ, L. D.; SHULMAN, G. I. 13C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p- 2369-2376, 1994.
- CROSS, D. A.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMING, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, p. 785- 789, 1995.

- CROSS, D. A.; WATT, P. W.; SHAW, M.; VAN DER KAAY, J.; DOWNES, C. P.; HOLDER, J. C.; COHEN, P. Insulin activates protein kinase B, inhibits glycogen synthase kinase-3 and activates glycogen synthase by rapamycin-insensitive pathways in skeletal muscle and adipose tissue. **FEBS Lett.**, v. 406, p. 211–215, 1997.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, vol.46, n.4, p. 419-425, 2002
- CASCAES, M. M.; GUILHON, G.M.S.P.; ANDRADRE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B.; SANTOS, L.S. Constituents and Pharmacological Activities of *Myrcia* (Myrtaceae): A Review of an Aromatic and Medicinal Group of Plants. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, p. 23881-23904, 2015.
- DALAR, A.; KONEZAK, I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from Eastern Anatolia. **Ind Crop Prod.**, v.4, p.383-390, 2013.
- DAVAL, M.; FOUFELLE, F.; FERRÉ, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. **J.Physiol.**, v. 574, n.1, p-55-62, 2006.
- DAVIDSON, J. A.; PARENTE, E. B.; GROSS, J. L. Incretin mimetics and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: Innovative treatment therapies for type 2 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 52, n.6, 2008.
- FERREIRA, E. A.; GRIS, E. F.; REBELLO, J. M.; CORREIA, J. F.; DE OLIVEIRA, L. F.; PEDROSA, R. C. The 2',4',6'-trihydroxyacetophenone isoletade from *Myrcia multiflora* has antiobesity and mixed hypolipidemic effects with reduction of lipid intestinal absorption. **Planta Med.**, v. 77, p. 1569-1574, 2011
- FERREIRA, V.; CAMPOS, S. Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2. **BJSCR.**, v. 8 , n.3, p. 72-78, 2014.
- FOSTER, J. D.; PEDERSON, B. A.; NORDLIE, R. C. Glucose -6- phosphatase structure, regulation and function: an update. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v.215, p.314-332, 1997.
- GANNON, M. C.. NUTTALL, F. G. Effect of feeding, fasting, and diabetes on liver glycogen syhntase activitiy, protein and mRNA in rats. **Diabetologia**, v. 40, p-758-763, 1997.
- GONZÁLEZ-FIGUEIREDO, M.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **J Pharm Biomed Anal.**, v.118, p.322-327, 2016.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F.; NIC LUGHDHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES – SILVA, L. H.; WILSON, P.G., LUCAS, E. World Checklist of Myrtaceae. **Kew Publishing Royal Botanic Gardens: Kew**, UK, 2014.
- HANSON, R. W.; RESHEF, L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 66, p. 581 – 611, 1997.
- HIKINO, H.; ISHIYAMA, M.; SUZUKI, Y.; KONNO, C. Mechanisms of hypoglycemic activity of ganoderan B: a glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. **Planta Med.**, v. 55, n. 5, p.423–428, 1989.
- HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. **Cell Metab.**, v. 5, n. 4, p. 237–252, 2007.

HSU, Y. J.; LEE, T. H.; CHANG, C. L. T. Anti-hyperglycemic and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. **J Ethnopharmacol.**, v. 122, p. 379- 383, 2009.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). Atlas da International diabetes federation, 2015. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>.

JENSEN, J.; RUSTAD, P. I.; KOLNES, A. J.; LAI, Y. C. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. **Front Physiol.**, n. 2, v. 112, 2011.

KAHN, B. B.; ALQUIER, T.; CARLING, D.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.**, n. 1, p. 15–25, 2005.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine J.**, v. 53, p. 267–293, 2006.

KARTHIC, K.; KIRTHIRAM, K. S.; SADASIVAM, S.; THAYUMANAVAN, B. Identification of alpha amylase inhibitors from *Syzygium cumini* Linn seeds. **Indian J Exp Biol.**, v. 46, n.9, p. 677-80, 2008.

KLIP, A. The many ways to regulate glucose transporter 4. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v. 34, p. 481–487, 2009

KUMAR, S.; NARWAL, S.; KUMAR, V.; PRAKASH, O. α -glucosidase inhibitors from plants: a natural approach to treat diabetes. **Pharmacogn Rev.**, v. 5, n. 9, 2011.

KUROSAKI, E.; NAKANO, R.; MOMOSE, K.; SHIMAYA, A.; SUZUKI, T.; SHIBASAKI, M.; SHIKAMA, H. Hypoglycemic agent YM440 suppresses hepatic glucose output via gluconeogenesis by reducing glucose-6-phosphatase activity in obese Zucker rats. **Eur. J. Pharmacol.** v.468, p-151- 158, 2003.

KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; KIM, Y. C.; SHETTY, K. Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. **J Med Food.** V. 10, n. 2, p. 266-75, 2007.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. **Brittonia**, v. 49, p. 508-536, 1997.

LIN, P. C.; HUNG, C. H.; CHAN, T. F.; LIN, K. C.; HSU, Y. Y.; TZENG, Y. L. The risks factors for gestational diabetes mellitus: A retrospective study. **Midwifery**, v. 42, p.16-20, 2016.

LIU, Y.; XU, J.; YUAN, C.; MA, H.; LIU, T.; LIU, F.; SEERAM, N. P.; MU, Y.; HUANG, M. Chemical composition and anti-hyperglycaemic effects of triterpenoid enriched *Eugenia jambolana* Lam. berry extract. **J Funct Foods.**, v. 28, p. 1-10, 2017.

LORENZI, H. Árvores brasileiras. **Editora Plantarum**, 2014, 384p.

MALHEIROS, P. V. S.; REGAZZINI, V. R.; SEGURA, P. A. R.; OLIVO, P. L.; STELLA, J. H.; STELLA, B. M. Efeito da infusão de *Myrcia guianensis* (Pedra-ume-cao) na glicemia e lipemia de ratos Wistar. **Perspect Med.**, v. 21, n.2, 2010.

MARASCHIN, J., F.; MURUSSI, N.; WITTER, V.; SILVEIRO, S, P. *Diabetes mellitus* classification. **Arq. Bras. Cardiol.**, n.2, v.95, p. 40-47, 2010.

- MATTE, A., TARI, L. W., GOLDIE, H., DELBAERE, L. Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. **J. Biol. Chem.** v. 272, p- 8105-8108, 1997.
- MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. *Diabetes mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Rev. Nutr.**, v.20, n.5, p. 515-524, 2007.
- MORA, A.; SAKAMOTO, K.; MCMANUS, E. J.; ALESSI, D. R. Role of the PDK1-PKB - GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart. **FESB Lett.**, v. 549, n.17, p. 3632 – 3638, 2005.
- NOGUCHI, R.; KUBOTA, H.; YUGI, K.; TOYOSHIMA, Y.; KOMIRI, Y.; SOGA, T.; KURODA, S. The selective control of glycolysis, gluconeogenesis and glycogenesis by temporal insulin patterns. **Mol. Syst. Biol.**, v.9, n.664, p. 1-12, 2013.
- NUUTILA, P.; KOIVISTO, V. A. ; KNUUTI, J.; RUOTSALAINEN, U.; TERAS, M.; HAAPARANTA, M.; BERGMAN, J.; SOLIN, O.; VOIPIO-PULKKI, L. M.; WEGELIUS, U. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. **J. Clin. Invest.**, v.89, n.6, p.1767-1774, 1992.
- O'BRIEN, R. M.; GRANNER, D. K. Regulation of gene expression by insulin. **Biochem J.**, v.278, p-609-619, 1991
- OTA, M.; OKAMOTO, T.; HOSHINO, W.; WAKABAYASHI, H. Action of α -D-glucosidase from *Aspergillus niger* towards dextrin and starch. **Carbohydr Polym.**, v. 78, p. 287–91.2009.
- PEDERSON, B. A., SCHORODER, J. M., PARKER, G., SMITH, M. W., DEPAOLI-ROACH, A. A., ROACH, P. J. Glucose metabolism in mice lacking muscle glycogen synthase. **Diabetes**, v. 54, 3466–3473, 2005.
- PELT, J.M. A “revolução verde” da medicina. **O Correio da Unesco**, v.7, n.9, p.8-16, 1979.
- PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetes Res**, v. 22, p. 49-57, 1993.
- PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest** , v. 106, p.165–169, 2000.
- PILKS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann Rev Physiol.**, v.54. p. 885-909.1992
- PIPARO, L. P. SCHEIB, H.; FREI, N.; WILLIAMSON, G.; GRIGOROV, M.; CHOU, J. C. Flavonoids for controlling starch digestion: structural requirements for inhibiting human α -amylase. **J. Med. Chem.**, v. 51, p. 3555-3561, 2008.
- PRASAD, R. C.; HERZOG, B.; BOONE, B.; SIMS, L.; WALTNER-LAW, M. An extract of *Syzygium aromaticum* genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. **J Ethnopharmacol**, v. 96, p. 295-301, 2005.
- POTT, A.; POTT, V. J.; SOUZA, T. W. Plantas daninhas de pastagens na região de cerrado. Corumbá: Embrapa Gado de Corte, 2006. 336p.
- RUI, L. Energy Metabolism in Liver. **Compr Physiol.**, v. 4, n.1, p. 177-197, 2014.

RUSSO, E. M.; REICHEL, A. A.; DE-SÁ Jr.; FURLANETTO, R. P.; MOISÉS, R. C.; KASAMATSU, T. S.; CHACRA, A. R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Braz J Med Biol Res.**, v. 23, p. 11-20, 1990.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS W.; DOKKEDAL, A. L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8402–8416, 2013.

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

SENAT, M. V.; DERUELLE, P. Gestational diabetes mellitus. **Gynecol Obstet Fertil**, v. 44, n.4 , p. 244-247, 2016.

SERPELONI, J. M.; LEAL SPECIAN, A. F.; RIBEIRO, D. L.; TUTTIS, K.; VILEGAS, W.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W.; DOKKEDAL, A. L.; SALDANHA, L. L.; DE SYLLOS CÓLUS, I. M.; VARANDA, E. A. Antimutagenicity and induction of antioxidant defense by flavonoid rich extract of *Myrcia bella* Cambess. in normal and tumor gastric cells . **J Ethnopharmacol.**, v. 176, p. 345 – 355, 2015.

SEYER, P.; VALLOIS, D.; POITRY-YAMATE, C.; SCHUTZ, F.; METREF, S.; TARUSSIO, D.; STAELS, B.; LANZ, B.; GRUETER, R.; DECARIS, J.; TURNER, S.; DA COSTA, A.; PREITNER, F.; MINEHIRA, K.; FORETZ, M.; THORENS, B. Hepatic glucose sensing is required to preserve beta cell glucose competence. **J Clin Invest**. v. 123, p. 1662–1676, 2013.

SHINDE, L.; TALDONE, T.; BARLETTA, M.; KUNAPARAJU, N.; HU, B.; KUMAR, S.; PLACIDO, J.; ZITO, S. W. Alpha glucosidase inhibitory activity of *Syzygium cumini* (Linn.) Skeels seed kernel *in vitro* and in Goto-Kakizaki (GK) rats. **Carbohydr Res**. v. 343, n. 7, p. 1278-1281, 2008.

SILVA, F. K. S.; ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S.; ZOGHBI, M. G. B. Levantamento das espécies conhecidas como pedra-ume-caá (Myrtaceae), com ênfase nas comercializadas na cidade de Belém, Pará, Brasil. **Biota Amazôn.**, v.5, p. 7-15, 2015.

SMITH, A. G.; MUSCAT, G. E. Skeletal muscle and nuclear hormone receptors: implications for cardiovascular and metabolic disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.37, n.10, p.2047-2063, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed., **Instituto Plantarum**, Nova Odessa, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Disponível em www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2016 Disponível em <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>.

SUMMERS, S. A.; WHITEMANh, E. L.; BIRNBAUM, M. J. Insulin Signaling in the adipocyte. **Int. J. of Obesity**. v.24, n 4, p-67-70, 2000.

- SUTHERLAND, C., O'BRIEN, R. M., GRANNER, D. K. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 351p. 1991-1999, 1996.
- TANIRA, M.O.M. Antidiabetic medicinal plants: a review of the present status and future directions. **Int. J. Diabetes.**, v.2, n.1, p. 15-22. 1994.
- TANIGUCHI, C. M., EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.7, p. 85–96, 2006.
- TAREDA, K., MINAMI, Y., TAKAMATSU, K.; MATSUOKA, T. Inhibition of alpha-glucosidase and alpha -amylase by flavonoids. **J Nutr Sci Vitaminol.**, v. 52, n.2, p. 149-153, 2006.
- TRIHN, K. Y.; O'DOHERTY, R. M.; ANDERSON, P.; LANGE, A.; NEWGARD, C. B. Perturbation of fuel homeostasis caused by overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in liver of normal rats. **J.Biol. Chem.** v.273, p. 31615 – 3162, 1998.
- THORBURN, A. W., GUMBINER, B., BULACAN, F., WALLACE, P., HENRY, R. R. Multiple defects in muscle glycogen synthase activity contribute to reduced glycogen synthesis in non-insulin dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v.87, p- 489-495, 1991.
- VAN DE WERVE, G.; LANGE, A.; NEWGARD, C.; MECHIN. M.; LI, Y.; BERTELOOT, A. New lessons in the regulation of glucose metabolism taught by the glucose-6-phosphatase system. **Eur. J. Biochem**, v. 267, p – 1533- 1549, 2000.
- VAREDA, P. M. P.; SALDANHA, L. L.; CAMAFORTE, N. A. P.; VIOLATO, N. M.; DOKKEDAL, A. L.; BOSQUEIRO, J. R. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3-K/AKT insulin signaling pathway. **J Evid Based Complement Alternat Med.**, v.2014, p.1-11, 2014.
- VELHO, G.; PETERSEN, K. F.; PERSEGHIN, G.; HWANG, J. H.; ROTHMAN, D. L.; PUEYO, M. E.; CLINEL, G. W.; FROGUEL, P.; SHULMAN, G. I. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p - 1755-1761, 1996.
- VIDNES, J.; SOVIK, O. Gluconeogenesis in infancy and childhood. III. Deficiency of the extramitochondrial form of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase in a case of persistent neonatal hypoglycaemia. **Acta Paediatr. Scand.**, v. 65, p. 307 – 312, 1976.
- VIOLLET, B.; FORETZ, M.; GUIGAS, B.; HORMAN, S.; DENTIN, R.; BERTRAND, L.; HUE, L.; ANDREELLI, F. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. **J Physiol**, v.574, p.41-53, 2006.
- WHITE M. F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol Cell Biochem**.v.182, p. 3-11, 1998.
- WHITECOMB, D. C.; LOWE, M. E. Human pancreatic digestive enzymes. **Dig Dis Sci.**, v. 52, n.1, p.1-17, 2007.
- WHITEMAN, E. L., CHO, H., BIRNBAUM, M. J. Role of Akt/protein kinase B in metabolism. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 13, p. 444–451, 2002.
- WOODGETT, J. R.; COHEN, P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-II (glycogen synthase kinase-5). **Biochim Biophys Acta.**, v. 788, p. 339–347, 1984.

WU, X.; MOTOSHIMA, H.; MAHADEV, K.; STALKER, T. J.; SCALIA, R.; GOLDSTIN, B. J. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v. 52, p. 1355–1363, 2003.

WUBSHET, G. S.; MORESCO, H. H.; TAHTAH, Y.; BRIGHENTE, C. M. I.; STAREK, D. High – resolution bioactivity profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR: α -glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia paulustri* DC. (Myrtaceae). **Phytochemistry**, v. 116, p. 246-252, 2015.

YIN, Z.; ZHANG, W.; FENG, F.; ZHANG, Y.; KANG, W. α - glucosidase inhibitors isolated from medicinal plants. **Food Science and Human Wellness.**, v. 3, p. 136-174, 2014.

YOU – GUI, L., DONG – FENG, J., SHI. Z., ZHI –QIANG, L., TIAN –BAO, L., SHI, C. Hibrid of 1- Deoxynojimycin and polysaccharide from Mulberry leaves treat *Diabetes mellitus* by activating PDX/INSULIN signaling pathway and regulating the expression of glucokinase phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose – 6 – phosphatase in alloxan – induce diabetic mice. **J Ethnopharmacol.**, v.134, p- 961- 970, 2011.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II: aldore redutase and a-glucosidase inhibitors from brazilian natural medicines, The leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Struture of myrciacitrins I and II and myrciphenones A and B. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 46, n. 1, p. 113-119, 1998.

8. *Anexos*

8.1- Certificado do comitê de ética para aprovação do projeto de pesquisa.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **466-CEUA**, sobre "Investigação dos mecanismos de ação hipoglicemiante do extrato bruto de *Myrcia bella* em fígado, músculo esquelético e tecido adiposo em modelo de diabetes tipo 1 por Estreptozotocina", sob a responsabilidade de **José Roberto Bosqueiro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado "Ad referendum" da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Botucatu, 22 de março de 2013.

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 13618-970 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 Fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibbunesp.br

8.2 – Paper submetido no ano de 2014 referente aos resultados obtidos durante o mestrado da aluna.

Hindawi Publishing Corporation
Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Volume 2014, Article ID 543606, 10 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/543606>



Research Article

***Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k/Akt Insulin Signaling Pathway**

**Priscilla Maria Ponce Vareda,¹ Luiz Leonardo Saldanha,¹
Nathalia Aparecida de Paula Camaforte,¹ Natalia Moretti Violato,¹
Anne Lígia Dokkedal,² and José Roberto Bosqueiro^{2,3}**

¹ Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), 18618-970 Botucatu, SP, Brazil

² Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), 17033-360 Bauru, SP, Brazil

³ Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), Avenida Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, 17033-360 Bauru, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to José Roberto Bosqueiro; bosqueir@fc.unesp.br

Received 21 January 2014; Accepted 3 April 2014; Published 27 April 2014

Academic Editor: Chong-Zhi Wang

Copyright © 2014 Priscilla Maria Ponce Vareda et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Species of *Myrcia* are used by indigenous people and in traditional communities in Brazil for the treatment of *Diabetes mellitus*. We investigated the hypoglycemic effect of the extract of leaves of *Myrcia bella* in diabetic mice. The chemical fingerprinting of the 70% EtOH extract characterized as main constituents flavonoid aglycones, flavonoid-*O*-glycosides, and acylated flavonoid-*O*-glycosides derivatives of quercetin and myricetin. Mice were treated with saline or extract of *M. bella* (300 or 600 mg/Kg b.w.) for 14 days. Body weight and water and food intake were measured every day. Fasting blood glucose was measured weekly. At the end of the treatment, blood insulin, triglycerides, total cholesterol, and protein were measured. Glycogen content and expression of proteins of the insulin signaling pathway were measured in liver. The treatment with 600 mg/Kg reduced the fasting blood glucose in diabetic mice of the 7th day as water and food intake and increased hepatic glycogen. Total cholesterol and triglycerides were reduced in diabetic treated mice. The treatment increased the expression of IRS-1, PI3-K, and AKT in the livers of diabetic treated mice. The results indicate that the extract of the leaves of *Myrcia bella* has hypoglycemic properties and possibly acts to regulate glucose uptake by the liver.

1. Introduction

Diabetes is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia as a result of defects in insulin action, insulin secretion, or both. This disorder results in abnormality in protein, lipid, and carbohydrate metabolism, leading to long-term complications, such as neuropathy, nephropathy, retinopathy, atherosclerosis, and peripheral vascular disease [1]. According to the report of world health organization (WHO), the world is now in the middle of a diabetes epidemic. In 1985, it was estimated that there were 30 million people with diabetes worldwide, and this number dramatically increased in the ensuing 10 years, reaching 135

million people. Estimates indicate that this number, by 2030, should grow to 366 million people with this syndrome, of which 90% will develop type 2 diabetes (DM2). Today, it is estimated that there are about 12 million diabetic patients in Brazil [2].

Current treatments for diabetes include the use of exogenous insulin and the administration of allopathic drugs, such as sulfonylureas (glibenclamide), biguanides (metformin), and alpha-glucosidase inhibitors (acarbose and miglitol). The oral hypoglycemic agents exert their effects in reducing glycemia through a variety of mechanisms that include reducing hepatic glucose production, increasing insulin secretion by pancreatic beta cells, improving insulin sensitivity, and

inhibiting digestion and intestinal absorption of glucose [3]. However, these drugs may cause side effects, decreasing response after prolonged use, and there is also a high financial cost to the patient [4]. Based on this information, research for new antidiabetic agents that maintain the same therapeutic efficacy with fewer side effects is necessary [5].

Myrcia bella is a plant belonging to the Myrtaceae family. This family consists of 133 genera and more than 3,800 species with two main centers of development in tropical America and Australia, although they occur in other regions of the world [6]. *Myrcia* is one of the largest genera in the Myrtaceae family with about 760 species and is well represented throughout the Brazilian territory [7]. Species of *Myrcia* have been used by indigenous and in traditional communities in Brazil as astringents and diuretics and for the treatment of hypertension and *Diabetes mellitus* [8, 9].

The plants known as “pedra-hume-caá” or insulin plants have been used for the treatment of diabetes according to the empirical African and indigenous knowledge that influenced the formation of the Brazilian culture [10]. The species related to “pedra-hume-caá” are *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia citrifolia*, *Myrcia guianensis*, *Myrcia uniflora*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia salicifolia*, and *Myrcia speciosa* [11–14]. Despite the large number of species within the genus, there are few studies that assess their potential hypoglycemic properties, and there is no experimental evidence that proves the hypoglycemic effect of *Myrcia bella*.

The aim of the present study was to evaluate the hypoglycemic effect of the extract of the leaves of *Myrcia bella* through the investigation of metabolic, biochemical, and molecular parameters. Body weight, food and water intake, fasting glycemia, blood triglycerides, total cholesterol and protein, basal plasma insulin, hepatic and muscular glycogen, and the expression of some proteins of the insulin signaling pathway in the liver of control and streptozotocin-diabetic mice were investigated.

2. Material and Methods

2.1. Plant Material and Extraction. The leaves of *M. bella* were collected in November 2010 at the Jardim Botânico Municipal de Bauru, SP, Brazil (22°20′30″ S and 49°00′30″ W). Voucher specimens were prepared, identified, and deposited at the Herbarium of the UNESP—Univ Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”—UNBA (Bauru, SP, Brazil) under number 5508. Fresh leaves were dried at 40°C for 48 h. The separated powdered leaves (1.3 kg) were extracted with EtOH/H₂O (7:3 v/v) by percolation at room temperature. The filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure at 40°C furnishing the hydroalcoholic extract (364 g).

2.2. Chemical Profiling and Identification. The chemical composition of the crude extract of *M. bella* was investigated by mass spectrometry using an Accela (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) LCQ Fleet with Ion Trap 3D and ionization by electrospray (ESI) in negative ion mode. The 70% EtOH extract was dissolved in MeOH–H₂O (8:2) and diluted at final concentration of 1 µg mL⁻¹. This solution was infused in

the ESI source by flow injection analysis (FIA) using a syringe pump; the flow rate was 33 µL·min⁻¹. The capillary voltage was –20 V, the spray voltage was 4 kV, and the tube lens offset was –55 V. The capillary temperature was 275°C. Nitrogen was used both as drying gas at a flow rate of 60 (arbitrary units) and as nebulizing gas. The nebulizer temperature was set at 280°C, and a potential of –4 V was used on the capillary. Negative ion mass spectra were recorded in the range *m/z* 100–1050. Two scan events were prescribed to run in the LCQ mass spectrometry. The first event was a full-scan spectrum to acquire data on the deprotonated compounds within the scan range. The second scan event was a MS/MSⁿ experiment performed using a data dependent scan on deprotonated molecule [M–H]⁻. The collision energy for MS/MSⁿ was adjusted to 10–25%. The constituents present in the 70% EtOH extract were identified by comparison of their MS/MSⁿ data with data from the literature [15].

2.3. Animals. Male Swiss mice (aged 2 months, weighting 20–30 g) were obtained from the Institute of Biosciences, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. The animals were kept under standard environmental conditions (22 ± 2°C) and 12 h light/dark cycle. Water and food were given *ad libitum*. The animals were killed by CO₂ exposure, followed by decapitation. The experimental protocol was approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of UNESP/Araçatuba (Process no. 01741-2012).

2.4. Acute Toxicity Test. Male Swiss normal mice were divided into 2 groups of 10 animals (CTL SAL and CTL EXT) and fasted during 4 hours. After this period saline (1 mL/Kg) or the extract of *Myrcia bella* (2,000 mg/Kg) was administered by gavage. The animals had their behavior analyzed at 30, 60, 90, 120, 240, and 360 minutes after the gavage according to the Hippocratic screening described by Brito [16]. The mice were observed and weighted during 14 days. At the end of the observation period, the animals were killed and liver, kidneys, lungs, heart, and spleen were collected and weighted. This screening provides a general estimate of the toxicity of the substance of the conscious state and general disposal, activity, and coordination of the motor system, reflexes, and activities of the central nervous system (posture, exploratory movements, stereotypes, presence of clonic, or tonic movements) and the autonomic nervous system (respiratory pattern, piloerection, and pupil size).

2.5. Induction of Experimental Diabetes. The induction of diabetes was performed using a single injection of 150 mg/Kg streptozotocin (STZ—Sigma—St. Louis, MO) in mice which fasted for 12 to 14 hours. The STZ was dissolved in citrate buffer (pH 4.5) and immediately injected intraperitoneally. The animals kept fasting for 3 hours after injection. In the next 24 hours the animals received a glucose solution of 3% to drink to prevent hypoglycemia. After a period of seven days, the mice fasted again (10 to 12 hours) and blood glucose was measured with glucometer (One Touch, Johnson & Johnson). The animals with fasting glucose higher than 250 mg/dL were considered diabetic and were included in the study.

2.6. Treatment. The mice were randomly divided into 4 groups ($n = 6\text{--}10/\text{group}$) of control and diabetic animals (CTL SAL—nondiabetic mice treated with saline, CTL EXT—nondiabetic mice treated with extract, STZ SAL—diabetic mice treated with saline, and STZ EXT—diabetic mice treated with extract). Saline (1 mL/Kg b.w.) and extract of the leaves of *Myrcia bella* (300 and 600 mg/Kg b.w., dissolved in saline) were administered orally by gavage once a day during 14 consecutive days.

2.7. Fasting Blood Glucose, Body Weight, and Food and Water Intake. The fasting blood glucose was measured weekly using a glucometer (One Touch, Johnson & Johnson). Body weight and water and food intake were monitored daily.

2.8. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT). The animals from the 4 groups ($n = 8$) of control and diabetic mice treated during 14 days with saline or extract of *Myrcia bella* (600 mg/Kg) fasted (10–12 h) and the fasting blood glucose was measured before the glucose load and defined as time 0. A glucose load (2 g/kg b.w.) was injected intraperitoneally after 30 minutes of extract or saline administrations. Blood glucose was collected from tail tip 15, 30, 60, and 90 minutes after the administration of the glucose and measured by commercial kits of enzymatic glucose (Doles, Goiás, Brasil).

2.9. Biochemical Parameters. At the end of treatment period, the animals were killed and blood samples were collected and centrifuged to obtain the serum. Total proteins, total cholesterol, and triglycerides were measured by commercial kits (Doles, Goiás, Brazil). Basal plasma insulin was measured using a rat/mouse insulin ELISA kit (Millipore, St. Charles, MO) in spectrophotometer (BioTek-PowerWave XS) according to the manufacturers.

2.10. Hepatic and Muscular Glycogen. Hepatic and muscular glycogen content was measured as previously described by Rafacho et al. [17]. Briefly, liver and muscle samples (300 to 500 mg) were transferred to test tubes containing 30% KOH (Mallinckrodt Baker, Paris, France) and boiled for 1 h until they were completely homogenised. Na_2SO_4 (Mallinckrodt Baker, Paris, France) was then added, and glycogen was precipitated with 100% ethanol. The samples were centrifuged at 800 g for 10 min, the supernatants were discarded, and the glycogen was dissolved in hot distilled water. Ethanol was added, and pellets were obtained after a second centrifugation. The pellets were then dissolved in distilled water to a final volume of 20 mL. The glycogen content was measured by treating a fixed volume of samples with phenol reagent and H_2SO_4 and the absorbance was read at 490 nm with a spectrophotometer (BioTek-PowerWave XS).

2.11. Protein Expression by Western Blotting. Livers from animals of all groups were collected and homogenized in an ice cold cell lyses buffer (Cell Signaling, Beverly, MA). Protein concentration was measured using the Bradford method, according to the manufacturer (Bio-Rad, Hercules, CA). Aliquots of total protein (100 μg) were boiled at

100°C for 4 minutes in 30% of the volume in Laemmli buffer. The samples were fractionated on electrophoresis system (Mini Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA) in polyacrylamide gel with the appropriate pore size for each molecular weight. After electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA) in the presence of 20% methanol and 0.02% SDS at constant voltage of 120 Volts. The membrane was then saturated with blocking solution containing 5% BSA basal solution (10 mM Trisma base, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) overnight. Afterwards, the membrane was washed with basal solution at room temperature (RT). The proteins were detected in the membrane after incubation for 3 h at 4°C with primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) specific for each protein in basal solution containing 3% albumin, followed by washing and incubation with peroxidase conjugated secondary antibody-HRP solution containing basal solution 1% skimmed milk at RT. The membranes were washed and incubated in dark room with luminol chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL) and exposed to autoradiographic film (Kodak T-Mat G/RA, Rochester, NY). The intensities of the bands were quantified by densitometry (Epson Expression 1600, Long Beach, CA).

2.12. Statistical Analyses. The results were expressed as Means \pm SEM. For multiple comparisons ANOVA was used followed by *Tukey's posttest* and for comparison of two groups, Student's *t*-test was used. The level of significance adopted was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical Profiling and Identification. The FIA-ESI-MS/MSⁿ analysis of the 70% EtOH extract highlighted the presence of precursor ions related to phenolic acids, flavonoid aglycones, flavonoid-*O*-glycosides, and acylated flavonoid-*O*-glycosides (Figure 1). The precursor ions at m/z 169 [M-H]⁻, 191 [M-H]⁻, and 197 [M-H]⁻ confirm the presence of phenolic acids. Second-generation product ion spectra of precursor ions at m/z 433 [M-H]⁻, m/z 447 [M-H]⁻, m/z 463 [M-H]⁻, m/z 585 [M-H]⁻, m/z 601 [M-H]⁻, m/z 615 [M-H]⁻, and m/z 635 [M-H]⁻ confirm the presence of flavonoid-*O*-glycosides and acylated flavonoid-*O*-glycosides. The neutral losses of 132, 162, 146, and 152 mass units allowed the identification of pentosides (xylose or arabinose), hexosides (glucose or galactose), deoxyhexoside (rhamnose), and gallic acid, respectively. The precursor ions at m/z 301 and 317 characterized aglycones as quercetin and myricetin, respectively.

3.2. Toxicity Test. The extract of *Myrcia bella* administrated to normal mice at a dose of 2,000 mg/Kg did not provoke deaths nor changes in the behavioral parameters analyzed (posture, secretions, and presence of convulsions) when compared with the group who received saline. There was no difference in body weight of the animals in both groups (Figure 2). The kidney weights from CTL EXT animals

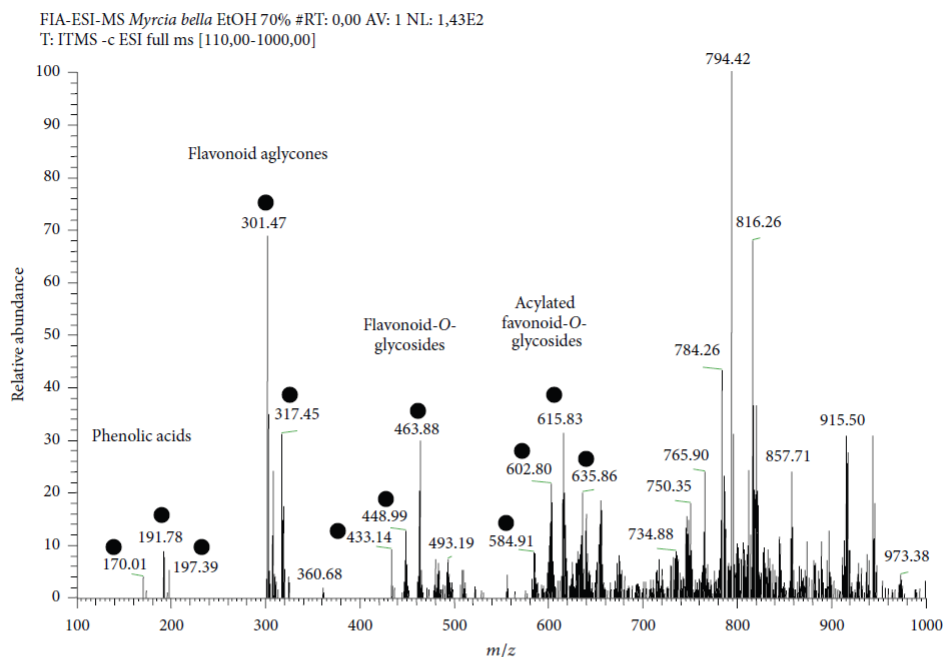


FIGURE 1: Chemical profile of *Myrcia bella*'s extract. Typical direct flow injection analysis FIA-ESI-IT-MS fingerprint spectra obtained in negative ion mode of the 70% EtOH from the leaves of *M. bella*. (●) Characteristics constituents fragmented.

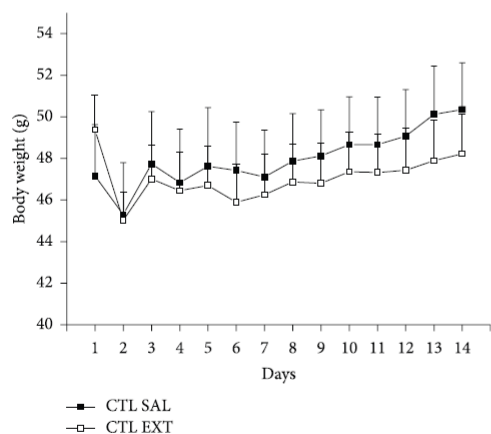


FIGURE 2: Body weight during acute toxicity test on male normoglycemic mice. Effect of acute administration of saline (CTL SAL) or crude extract of *M. bella* (2,000 mg/Kg-CTL EXT) on the body weight of normoglycemic mice. Data are Means \pm SEM, $n = 10$, $P < 0.05$. Student's *t*-test.

increased significantly (14.27 ± 0.47 g/Kg) when compared with CTL SAL animals (12.73 ± 0.41 g/Kg) (Table 1, $P < 0.05$).

TABLE 1: Effect of the acute administration of saline (1 mL/Kg) or crude extract of *M. bella* (2000 mg/Kg) on organs weight of male mice.

Organs weight (g/Kg)	CTL SAL	CTL EXT
Spleen	4.04 ± 0.32	4.71 ± 0.53
Heart	4.81 ± 0.12	5.06 ± 0.24
Liver	55.85 ± 1.72	58.66 ± 1.29
Lung	8.94 ± 0.92	9.67 ± 0.36
Kidney	12.73 ± 0.41	$14.27 \pm 0.47^*$

CTL SAL (control mice treated with saline), CTL EXT (control mice treated with *M. bella* extract), STZ SAL (diabetic mice treated with saline), and STZ EXT (diabetic mice treated with *M. bella* extract). Values are expressed as Means \pm SEM. * versus CTL SAL, $n = 10$, $P < 0.05$.

3.3. Effect of the Treatment with the Extract of *Myrcia bella* on Fasting Blood Glucose. Diabetic mice (STZ SAL and STZ EXT) showed a significant increase in fasting blood glucose when compared with control groups (CTL SAL and CTL EXT) ($P < 0.001$). Diabetic mice treated with the extract of *M. bella* at 300 mg/Kg (STZ EXT) showed no decrease in fasting blood glucose when compared with diabetic animals treated with saline (STZ SAL) (Figure 3(a)). However, STZ EXT animals treated with 600 mg/Kg of the extract of *M. bella* (STZ EXT) showed a significant decrease in fasting blood glucose from the 7th day to the last day of treatment compared with STZ SAL; the decrease was maintained until

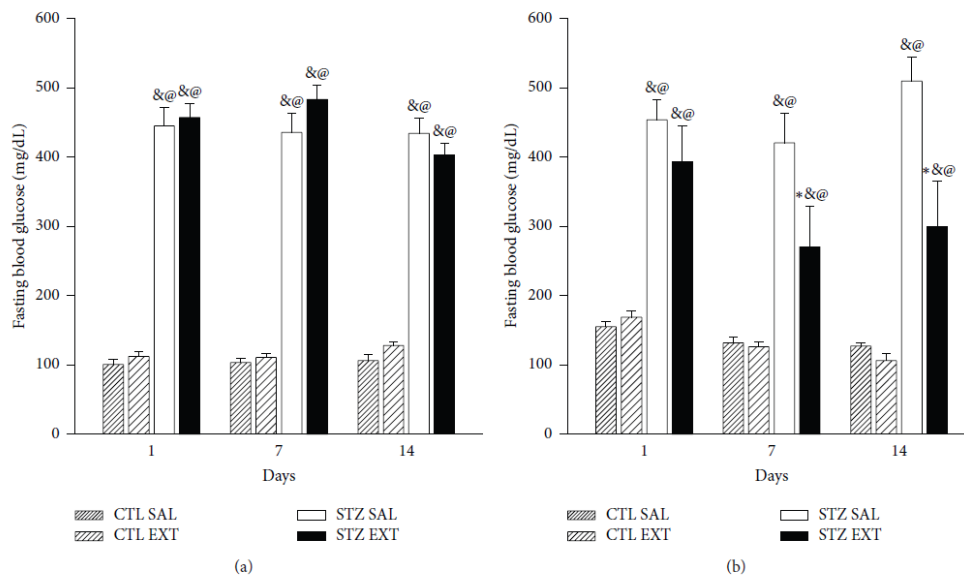


FIGURE 3: Effect of *Myrcia bella* administration (300 and 600 mg/Kg) on fast blood glucose. Fast blood glucose (mg/dL) of control and diabetic mice treated with saline (CTL SAL and STZ SAL), 300 mg/Kg (a) or 600 mg/Kg (b) of the crude extract of *M. bella* (CTL EXT and STZ EXT) during 14 days. Data are Means \pm SEM. * versus STZ SAL; @ versus CTL SAL, & versus CTL EXT, $n = 10$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's *posttest*.

the end of the treatment (Figure 3(b)) ($P < 0.05$). On the 7th day of treatment, there was a 36% decrease in fasting glucose of STZ EXT animals compared with animals of the STZ SAL group. On the 14th day, the decrease reached 41.3% between the two groups. There was no difference in fasting blood glucose between the control groups (CTL SAL and CTL EXT). Because the treatment with the crude extract of *Myrcia bella* was effective in lowering blood glucose at a dose of 600 mg/Kg, the dose was used for the rest of the experiments.

3.4. Effect of the Treatment with the Extract of *Myrcia bella* on ipGTT. The ipGTT was performed according to the effective hypoglycemic dose of the extract (600 mg/Kg). Diabetic animals treated with the extract (STZ EXT) showed a significant decrease in glycemia at 30, 60, and 90 minutes ($P < 0.05$) after glucose administration (2 g/Kg) compared with diabetic animals treated with saline (STZ SAL) (Figure 4(a)). The area under the curve (AUC) (Figure 4(b)) was increased in both diabetic groups when compared with the control groups (CTL SAL and CTL EXT) ($P < 0.001$). Nevertheless, there was a decrease in AUC of the STZ EXT group when compared with the STZ SAL group ($P < 0.05$). There was no difference in blood glucose and AUC between the control groups.

3.5. Effect of the Treatment with the Extract of *Myrcia bella* on Body Weight and Food and Water Intake. The body weight of the diabetic animals (STZ SAL and STZ EXT) showed a significant decrease compared with the body weight of

the control group treated with saline (CTL SAL) as of the 7th day of treatment (Figure 5) ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between body weights of diabetic animals of the groups STZ SAL and STZ EXT. There was a decrease of body weight of control animals treated with the extract (CTL EXT) compared with control animals treated with saline (CTL SAL) as of the 7th day of treatment ($P < 0.05$). Diabetic animals (STZ SAL and STZ EXT) showed a significant increase in water intake compared to the control groups (CTL SAL and CTL EXT) (Figure 6(a)) ($P < 0.001$). Diabetic animals treated with the extract of *M. bella* (STZ EXT) showed a decrease of 42% in water intake when compared to diabetic mice treated with saline (STZ SAL) ($P < 0.05$). There was no difference between the control groups (CTL SAL and CTL EXT). Regarding food intake, diabetic animals (SAL STZ and STZ EXT) showed a significant increase compared with the control groups (CTL SAL and CTL EXT) (Figure 6(b)) ($P < 0.001$). Diabetic animals treated with a crude extract of *M. bella* (STZ EXT) showed a decrease of 38.46% in food intake compared with diabetic animals treated with saline (STZ SAL) ($P < 0.001$). There was no difference between the control groups (CTL SAL and CTL EXT).

3.6. Biochemical Parameters. Total triglycerides (TG) and cholesterol (TC) were increased in diabetic animals treated with saline (STZ SAL) compared with control groups (CTL SAL and CTL EXT) ($P < 0.05$). The treatment with the

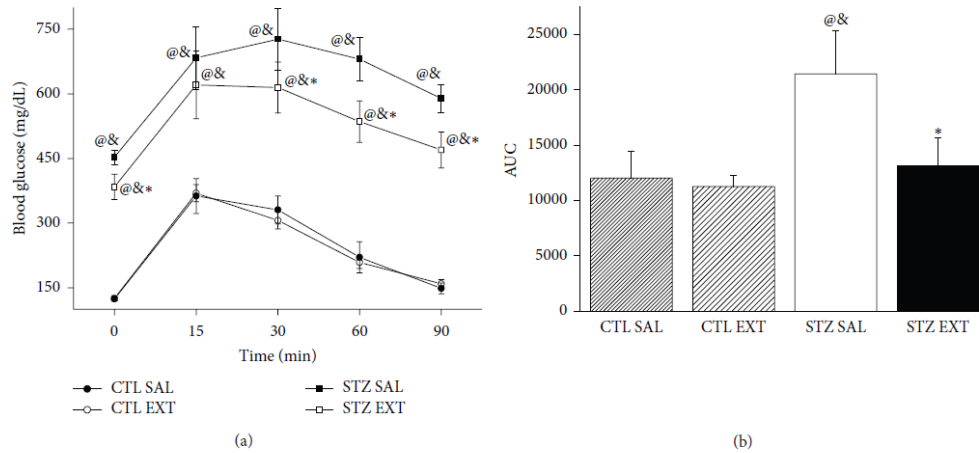


FIGURE 4: Intraperitoneal glucose tolerance test. Glycemia after intraperitoneal glucose administration (2 g/Kg) (a) and area under the curve (AUC) (b) in control and diabetic mice treated with saline (CTL SAL and STZ SAL) or with 600 mg/Kg of the crude extract of *M. bella* (CTL EXT and STZ EXT) during 14 days (CTL EXT and STZ EXT). Data are Means \pm SEM. * versus STZ SAL; @ versus CTL SAL; & versus CTL EXT, $n = 8$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's *posttest*.

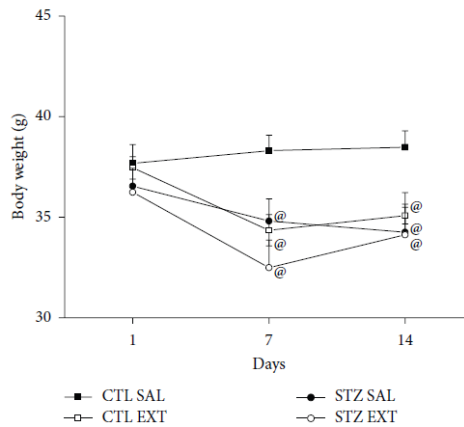


FIGURE 5: Effect of *Myrcia bella* administration (600 mg/Kg) on the body weight. Body weight (g) of control and diabetic animals treated with saline (CTL SAL and STZ SAL) or with 600 mg/Kg of the crude extract of *M. bella* during 14 days (CTL EXT and STZ EXT). Data are Means \pm SEM. @ versus CTL SAL, $n = 8$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's *posttest*.

extract of *Myrcia bella* at 600 mg/Kg for 14 days decreased the TG and TC levels of the animals from STZ EXT and CTL EXT groups when compared with the animals of the STZ SAL and CTL SAL groups, respectively ($P < 0.05$). The decrease was 49.65% and 45.5% in the levels of TG of STZ EXT and CTL EXT compared to STZ SAL and CTL SAL, respectively, and 53.4% and 48.6% in the levels of TC of STZ EXT and CTL EXT compared to STZ SAL and CTL SAL, respectively. There was no difference in total blood proteins between the groups. Basal plasma insulin decreased in STZ

SAL (0.11 ± 0.005 ng/mL) and STZ EXT (0.13 ± 0.01 ng/mL) when compared with CTL SAL (0.19 ± 0.02 ng/mL) and CTL EXT (0.19 ± 0.01 ng/mL) ($P < 0.05$). There was no difference between basal insulin of STZ SAL and STZ EXT (Table 2).

3.7. Hepatic and Muscular Glycogen. The hepatic and muscular glycogen contents in diabetic mice treated with saline (STZ SAL) decreased compared to the control groups (CTL SAL and CTL EXT) ($P < 0.05$). The treatment with *Myrcia bella* increased hepatic glycogen content in diabetic mice

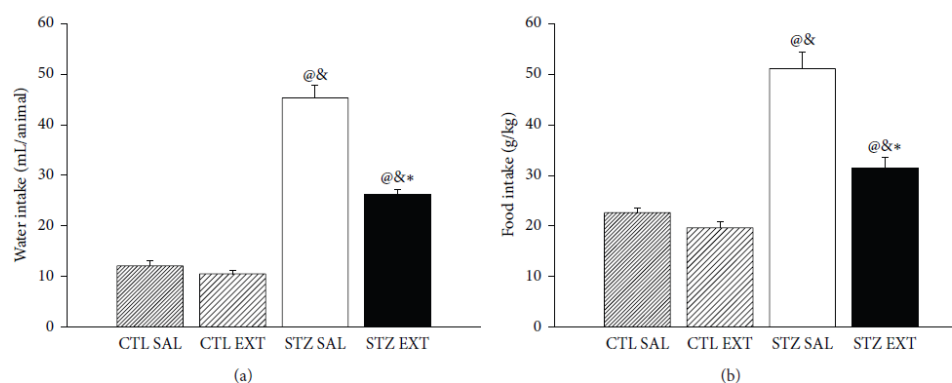


FIGURE 6: Effect of *Myrcia bella* administration (600 mg/Kg) on water and food intake. Water intake (mL/animal) (A) and food intake (B) of control and diabetic mice treated with saline (CTL SAL and STZ SAL) or with 600 mg/Kg of the crude extract of *M. bella* (CTL EXT and STZ EXT) during 14 days. Data are Means \pm SEM. * versus STZ SAL; @ versus CTL SAL, & versus CTL EXT, $n = 8$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's *posttest*.

TABLE 2: Biochemical parameters and glycogen levels of control and diabetic mice treated during 14 days with saline or crude extract of *M. bella* (600 mg/Kg).

Parameters	CTL SAL	CTL EXT	STZ SAL	STZ EXT
Triglycerides (mg/dL)	105.1 \pm 12.5	79 \pm 17.88 [@]	139.4 \pm 12.6 ^{@&}	70.2 \pm 8.18 ^{@*}
Total cholesterol (mg/dL)	142.9 \pm 12	83.6 \pm 14.8 [@]	190 \pm 13.8 ^{@&}	88.5 \pm 11.3 ^{@*}
Total protein (mg/dL)	4.89 \pm 1.37	3.9 \pm 0.94	2.7 \pm 0.47	3.59 \pm 0.37
Basal insulin (ng/mL)	0.19 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.11 \pm 0.005 ^{@&}	0.13 \pm 0.01 ^{@&}
Hepatic glycogen (mg%)	0.33 \pm 0.07	0.33 \pm 0.05	0.11 \pm 0.03 ^{@&}	0.28 \pm 0.06 [*]
Muscular glycogen (mg%)	0.21 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02	0.15 \pm 0.01 ^{@&}	0.17 \pm 0.01 ^{@&}

CTL SAL (control mice treated with saline), CTL EXT (control mice treated with *M. bella* extract), STZ SAL (diabetic mice treated with saline), and STZ EXT (diabetic mice treated with *M. bella* extract). Values are expressed as Means \pm SEM. * versus STZ SAL, [@] versus CTL SAL, [&] versus CTL EXT, $n = 8$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's *posttest*.

(0.28 \pm 0.06 mg%) when compared with the diabetic animals treated with saline (0.11 \pm 0.03 mg%) ($P < 0.05$). There was no difference between control groups (CTL SAL and CTL EXT). There was no difference in the muscular glycogen content of diabetic STZ EXT and STZ SAL and between control groups (Table 2).

3.8. Protein Expression by Western Blotting. The expression of total and phosphorylated levels of IRS-1, PI3-K, and AKT in the livers of the animals of all groups was measured. The relative expression of p-IRS-1/IRS-1 (Figure 7(a)), p-PI3-K/PI3-K (Figure 7(b)), and p-AKT/AKT (Figure 7(c)) showed a significant increase in STZ EXT (1.04 \pm 0.3; 0.95 \pm 0.16; 1.5 \pm 0.23, resp.) when compared with animals of the STZ SAL group (0.25 \pm 0.1; 0.55 \pm 0.1; 0.88 \pm 0.07, resp.) ($P < 0.05$). There was no difference between the control groups.

4. Discussion

In this study, we investigated the hypoglycemic activity of the extract of leaves of *Myrcia bella* administered to

streptozotocin-induced diabetic mice. The selected dose for the treatment of animals was chosen according to the effectiveness of the tested doses. The treatment with the crude extract of *Myrcia bella* using 300 mg/Kg b.w. for 14 days did not reduce the hyperglycemia of the diabetic animals. Once the treatment with the extract of *Myrcia bella* was effective in lowering blood glucose at the dose of 600 mg/Kg for 14 days, this dose was chosen to carry out the proposed experiments.

The popular use of species of *Myrcia* is well known. *Myrcia multiflora*, known as "pedra-hume-de caá," is used in folk medicine for the treatment of diabetes, diarrhea, enteritis, and hemorrhages [10, 11, 13]. *Myrcia bella* is a species belonging to the Myrtaceae family that occurs in the Brazilian cerrado, and its hypoglycemic effects have not previously been investigated.

Hyperglycemia resulting from DM is a consequence of defects or a lack of insulin secretion and/or action [1]. The studies with experimental models of diabetes in rodents have been widely used with the intent to reproduce the symptoms of diabetes. The most common substances used to induce diabetes in rodents are alloxan and streptozotocin

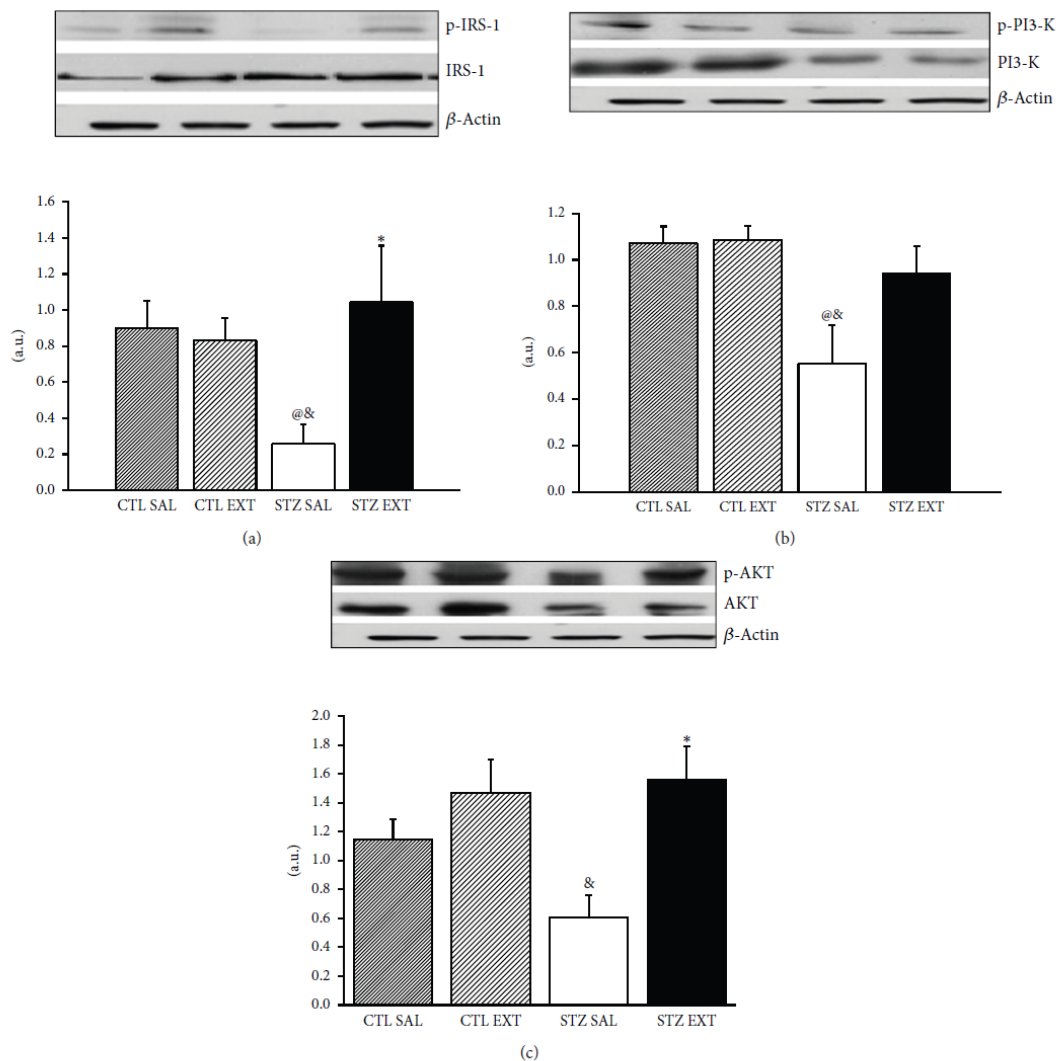


FIGURE 7: Protein expression in liver. Western blot analysis of IRS-1 (a), PI3-K(b), and AKT (c) from liver of control and diabetic mice treated with saline (CTL SAL and STZ SAL) or with 600 mg/Kg of the crude extract of *M. bella* during 14 days (CTL EXT and STZ EXT). p-IRS-1, p-PI3-K, and P-AKT are the phosphorylated forms of the respective proteins. Data are Means \pm SEM. * versus STZ SAL, @ versus CTL SAL, & versus CTL EXT, $n = 6$, $P < 0.05$. ANOVA followed by Tukey's posttest.

[18]. The animals induced to diabetes by STZ show symptoms such as polyphagia, polydipsia, polyuria, and weight loss, as seen in our streptozotocin-injected animals. Water and food intake decreased in animals of the STZ EXT group when compared with the animals of the STZ SAL group. Pepato et al. [19] showed that the extract of *Myrcia uniflora* decreased polyphagia and polydipsia and reduced the hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic animals. Our present results are in agreement with this report. Body weight was decreased in diabetic animals, and the treatment with the extract did not

alter weight loss. An interesting finding was the effect of the extract in the control mice. There was a significant decrease in the weight of those animals, as well as in triglycerides and total cholesterol. Since weight loss is desirable in many situations, particularly in preventing the development of type 2 diabetes, this effect should be investigated further. According to Table 1 and to the behavioral analysis, the extract seems to be nontoxic to the animals, although the ratio of kidney weight to body weight had an increase of 12.1% with the administration of high dose of the extract (2,000 mg/kg),

indicating a possible degree of toxicity of the extract when in excess. However, the urinary rate was not affected in this situation.

After 14 days of treatment with the extract of *M. bella* at 600 mg/Kg, we observed a significant reduction of the hyperglycemia in the treated diabetic mice (STZ EXT) when compared with diabetic mice treated with saline (STZ SAL). The reduction began at the 7th day of the treatment and remained until the end, proving the hypoglycemic effect of the treatment. The ipGTT showed a significant increase in glucose tolerance of STZ EXT animals when compared with STZ SAL animals, which indicates a better handling of glucose.

The chemical fingerprinting of the 70% EtOH leaves extract by FIA-ESI-IT-MS confirmed the presence of the main characteristic constituents of *Myrcia bella* as phenolic acids and flavonoids [15]. Flavonoids present a variety of biochemical and pharmacological actions that may affect the function of various mammalian cell systems [20]. Several studies have shown that flavonoids, which are naturally occurring phenolic compounds that are widely distributed in plants, can act in lowering blood glucose in experimental models of diabetes. Such studies using isolated flavonoids, such as quercetin and myricetin, showed a reduction in the fasting blood glucose of diabetic rats induced by streptozotocin [21–23]. Vassal et al. [22] showed that isolated quercetin administered at 10 and 15 mg in streptozotocin-induced diabetic rats reduced fasting blood glucose, total cholesterol, and triglycerides as it regenerates the pancreatic islet. Ong and Khoo [21] found that myricetin administered for 2 days at 3 mg/12 h reduced glycemia in 50% of diabetic rats as hepatic glycogen increased, indicating that myricetin should have an effect on glycogen metabolism. Accordingly, the flavonoids present in the crude extract obtained from leaves of *M. bella* should assist in the reduction of blood glucose through mechanisms that involve the reduction of hepatic glucose production and/or that promote the storage of glucose in the liver. The presence of phenolic acids was also detected in the extract of *M. bella*. This group of substances is characterized by their antioxidant properties. Also, it was demonstrated that caffeic acid and chlorogenic acid increased glucose uptake in L6 muscular cells and stimulate insulin secretion from the INS-1E insulin-secreting cell line and rat islets of Langerhans [24]. Phenolic acids also have the capacity to inhibit enzymes like α -glucosidase [25] and protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) [26]. In this study, the increase in p-IRS-1 expression, discussed below, arises the possibility for the participation of phenolic acids in the observed effects of the extract of *M. bella*.

Glycogen is the form in which some tissues store glucose. Insulin stimulates the accumulation of glycogen by increasing glucose transport in muscle and glycogen synthesis in the liver and in muscle [27]. In diseases such as diabetes, hepatic and muscular glycogen is decreased, as seen in diabetic mice treated with saline in this study (STZ SAL). The treatment with the extract of *M. bella* augmented the content of the glycogen in the liver of STZ EXT animals when compared with STZ SAL. This increase may occur through the activation of glycogenesis and/or inhibition of processes

such as glycogenolysis and gluconeogenesis, all of which are regulated by insulin [27]. The glycogen content in the muscles of diabetic animal treated with the extract was not affected by the treatments, suggesting that muscle tissue is not significantly involved in glucose handling in this situation.

Dyslipidemia is frequently found among the complications in diabetic patients and represents a serious risk for cardiovascular disease. The most common lipid abnormalities found in patients with diabetes are hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia [28]. The levels of total cholesterol and triglycerides increased in the diabetic animals of the STZ SAL group. The treatment with the extract of *M. bella* reduced the levels of TC and TG in animals in the STZ EXT and CTL EXT groups when compared with STZ SAL and CTL SAL, respectively. These results indicate a possible beneficial hypolipidemic activity of *M. bella* extract. The intake of flavonoids and other phenolic compounds is associated with a decreased risk of cardiovascular diseases, since these compounds are involved in lowering lipid levels and decreasing LDL oxidation [20]. Among the multiple effects of flavonoids, they have antioxidant properties as free radical scavengers by chelating metal ions, thereby protecting cells from free radicals and therefore lipid peroxidation [29]. Flavonoids may also reduce the oxidation of excess lipids in blood circulation by ROS that can generate cardiovascular problems [30, 31]. It can be suggested, therefore, that the presence of flavonoids in the extract administered to the mice may have affected lipid metabolism by lowering the levels of triglycerides and cholesterol.

The extract of *Myrcia bella* did not alter the plasma insulin levels of treated diabetic mice. These results indicate a possible extrapancreatic action of the extract, as there was no difference in basal insulin levels between diabetic mice treated with saline and the extract.

In order to further investigate the mechanisms involved in the reduction of blood glucose levels of diabetic animals and in the increase in storage of glucose in the liver, the expressions of some key proteins at the insulin signaling pathway were analyzed. The PI3-K/AKT pathway is the primary pathway activated by insulin through its receptor (IR). Upon its activation, a cascade of events mediated by protein-protein interactions takes place, which leads to the metabolic actions of insulin. The PI3-K activated by insulin is responsible, among other functions, for the phosphorylation and activation of AKT, which, in phosphorylated form, is responsible for both storing and preventing the degradation of glucose in the liver [27]. The treatment with *M. bella* in diabetic animals (STZ EXT) leads to an increase in the expressions of IRS-1, PI3-K, and AKT in comparison with the diabetic animals treated with saline (SAL STZ), indicating that the hypoglycemic action of the extract, at least in part, involves the activation of the insulin signaling pathway involving PI3-K/AKT proteins. The molecular mechanisms by which flavonoids and phenolic acids stimulate the expression of proteins are unknown, but this is a current found effect described in the literature.

The data showed in this study indicates that the improvement of glucose metabolism in STZ EXT should occur through an increase in the expression of key proteins of the

insulin pathway that activate the process of glycogenesis and inhibit the processes of gluconeogenesis and glycogenolysis. Moreover, the extract can act as a hypolipidemic agent, given the decreased levels of serum lipids. The characterization of the extract of *Myrcia bella* as a hypoglycemic and hypolipidemic agent opens an interesting field of investigation, requiring further studies about the mechanisms involved.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

The authors are grateful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP) for the financial support.

References

- [1] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*," *Diabetes Care*, vol. 34, supplement 1, pp. S62–S69, 2011.
- [2] Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009, http://www.diabetes.org.br/attachments/diretrizes09_final.pdf.
- [3] A. Y. Y. Cheng and I. G. Fantus, "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 *Diabetes mellitus*," *Canadian Medical Association Journal*, vol. 172, no. 2, pp. 213–226, 2005.
- [4] J. K. Grover, S. Yadav, and V. Vats, "Medicinal plants of India with anti-diabetic potential," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 81, no. 1, pp. 81–100, 2002.
- [5] A. Kumar, R. Ilavarasan, T. Jayachandra et al., "Anti-diabetic activity of *Syzygium cumini* and its isolated compound against streptozotocin-induced diabetic rats," *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 2, no. 9, pp. 246–249, 2008.
- [6] P. G. Wilson, M. M. O'Brien, P. A. Gadek, and C. J. Quinn, "Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups," *American Journal of Botany*, vol. 88, no. 11, pp. 2013–2025, 2001.
- [7] M. D. De Cerqueira, E. J. De Marques, D. Martins, N. F. Roque, F. G. Cruz, and M. L. D. S. Guedes, "Seasonal variation of the composition of essential oil from *Myrcia salzmannii* berg. (myrtaceae)," *Química Nova*, vol. 32, no. 6, pp. 1544–1548, 2009.
- [8] E. M. Russo, A. A. Reichelt, J. R. De-Sa et al., "Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 23, no. 1, pp. 11–20, 1990.
- [9] G. Hashimoto, *Illustrated Cyclopedic of Brazilian Medicinal Plants*, Aboc-Sha, Kamakura, Japan, 1996.
- [10] L. I. F. Jorge, J. P. L. Aguiar, and M. L. Silva, "Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugia panicifolia*-Myrtaceae)," *Acta Amazonica*, vol. 30, pp. 49–57, 2000.
- [11] M. Yoshikawa, H. Shimada, N. Nishida et al., "Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 46, no. 1, pp. 113–119, 1998.
- [12] R. P. Limberger, M. Sobral, A. T. Henriques, C. Menut, and J. Bessi re, "Essential oils from *Myrcia* species native to Rio Grande do Sul," *Química Nova*, vol. 27, no. 6, pp. 916–919, 2004.
- [13] H. Matsuda, T. Morikawa, and M. Yoshikawa, "Antidiabetogenic constituents from several natural medicines," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 74, no. 7, pp. 1301–1308, 2002.
- [14] H. Matsuda, N. Nishida, and M. Yoshikawa, "Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): structures of myrciacitrins III, IV, and V," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 50, no. 3, pp. 429–431, 2002.
- [15] L. L. Saldanha, W. Vilegas, and A. L. Dokkedal, "Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MSn and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR," *Molecules*, vol. 18, no. 7, pp. 8402–8416, 2013.
- [16] A. S. Brito, *Manual de Ensaios Toxicol gicos*, Ci ncias M dicas, Campinas, Brazil, 1995.
- [17] A. Rafacho, L. P. Roma, S. R. Taboga, A. C. Boschero, and J. R. Bosqueiro, "Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 85, no. 5, pp. 536–545, 2007.
- [18] T. Szkudelski, "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas," *Physiological Research*, vol. 50, no. 6, pp. 537–546, 2001.
- [19] M. T. Pepato, J. R. Oliveira, I. C. Kettelhut, and R. H. Miglioni, "Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats," *Diabetes Research*, vol. 22, no. 2, pp. 49–57, 1993.
- [20] E. Middleton Jr., C. Kandaswami, and T. C. Theoharides, "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer," *Pharmacological Reviews*, vol. 52, no. 4, pp. 673–751, 2000.
- [21] K. C. Ong and H. Khoo, "Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats," *Life Sciences*, vol. 67, no. 14, pp. 1695–1705, 2000.
- [22] M. Vessal, M. Hemmati, and M. Vasei, "Antidiabetic effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats," *Comparative Biochemistry and Physiology-C Toxicology and Pharmacology*, vol. 135, no. 3, pp. 357–364, 2003.
- [23] I.-M. Liu, S. Liou, T. Lan, F. Hsu, and J. Cheng, "Myricetin as the active principle of *Abelmoschus moschatus* to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats," *Planta Medica*, vol. 71, no. 7, pp. 617–621, 2005.
- [24] L. W. Qi, E.-H. Liu, C. Chu, Y. Peng, H. Cai, and P. Li, "Antidiabetic agents from natural products—an update from 2004 to 2009," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 10, no. 4, pp. 434–457, 2010.
- [25] M. Jung, M. Park, H. C. Lee, Y. Kan, E. S. Kang, and S. K. Kim, "Antidiabetic agents from medicinal plants," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 1203–1218, 2006.
- [26] C. S. Jiang, L. F. Liang, and Y. W. Guo, "Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades," *Acta Pharmacologica Sinica*, vol. 33, pp. 1217–1245, 2012.
- [27] J. B. C. Carvalheira, H. G. Zecchin, and M. J. A. Saad, "Insulin signaling pathways," *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, vol. 46, no. 4, pp. 419–425, 2002.
- [28] S. Lehto, T. R nnemaa, S. M. Haffner, K. Py r l , V. Kallio, and M. Laakso, "Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM," *Diabetes*, vol. 46, no. 8, pp. 1354–1359, 1997.

- [29] K. Rahman, "Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors," *Clinical Interventions in Aging*, vol. 2, no. 2, pp. 219–236, 2007.
- [30] W. C. Dornas, T. T. Oliveira, R. G. Rodrigues-das-Dores, A. F. Santos, and T. J. Nagem, "Flavonoids: therapeutic potential against oxidative stress," *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada*, vol. 28, no. 3, pp. 241–249, 2007.
- [31] C. G. Wang, S. R. Mehendale, T. Calway, and C. S. Yuan, "Botanical flavonoids on coronary heart disease," *American Journal of Chinese Medicine*, vol. 39, no. 4, pp. 661–671, 2011.