

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO
HIPOGLICEMIANTE DO EXTRATOBRUTO DE *Bauhinia
holophylla* EM FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
CAMUNDONGOS DIABÉTICOS TIPO 1 INDUZIDOS POR
ESTREPTOZOTOCINA.**

NATHALIA AP. DE PAULA CAMAFORTE HENRIQUES

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, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientador: José Roberto Bosqueiro



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO
EXTRATOBRUTO DE *Bauhinia holophylla* EM FÍGADO E
MÚSCULO ESQUELÉTICO EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS TIPO 1 INDUZIDOS POR
ESTREPTOZOTOCINA.**

NATHALIA AP. DE PAULA CAMAFORTE HENRIQUES

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, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

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-CRE 8/5651

Henriques, Nathalia Aparecida de Paula Camaforte.
Investigação dos mecanismos de ação do extrato bruto de
Bauhinia holophylla em fígado e músculo esquelético em modelo
de diabetes tipo 1 induzidos por estreptozotocina / Nathalia
Aparecida de Paula Camaforte Henriques. - Botucatu, 2016

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

1. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 2. Fitoterapia.
3. Síndrome metabólica. 4. Diabetes mellitus. 5. Pata de vaca.
6. Hipoglicemiantes. 7. Estreptozocina. 8. Cerrados.

Palavras-chave: Cerrado; Doença metabólica; Fitoterapia;
Hipoglicemiante; Plantas medicinais.

Auxílio financeiro (Processo Fapesp nº 2013/10708-0)



Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosana e Emílio, que são meu porto seguro. Palavras nunca serão o suficiente para expressar o tamanho do meu amor e gratidão. Vocês acreditaram em mim mais do que eu mesma! Esse título é de vocês!

Agradecimientos

*Agradeço em especial ao meu amor e companheiro da vida,
Diego. Obrigada por sonhar comigo os sonhos mais loucos e por
fazer parte de cada resultado, bom ou ruim, da minha vida! Sem
você nada teria sentido! Você é o melhor ajudante dos meus fins
de semana no laboratório!*

“Eu te amo todo dia, diariamente, pra sempre!”

Agradeço,

A Deus em primeiro lugar, pois Ele é a grande razão da minha vida, meu amigo e meu redentor.

Em especial ao meu orientador e amigo José Roberto Bosqueiro por ter acreditado em mim e por me ajudar a realizar esse sonho! Nada que eu faça será o suficiente para lhe retribuir! Obrigada, principalmente, por me deixar caminhar com as minhas próprias pernas.

Em especial aos meus irmãos, Vinícius e Renan. Juntos, somos os três mosqueteiros e será assim para sempre! Vocês são meus melhores amigos e seremos sempre nós contra o mundo! Eu amo vocês!

Agradeço a família mais louca do mundo, a minha! Nós nos completamos nas loucuras uns dos outros e no meio das diferenças, encontramos o amor. Nós somos um muro e será assim sempre! Obrigada por cada oração! Sei que cada um de vocês torceu e sonhou comigo.

Agradeço a minha sogra e amiga, primeiramente por sua amizade e alegria! E depois, por ter me dado o melhor presente do mundo: seu filho!

Aos meus pastores Henrique, Isabel, Loide e a toda igreja Efrata pelas orações e momentos de risadas juntos! Amo vocês!

Agradeço aos meus amigos Dessa, Rafa e Má simplesmente por existirem e me deixarem fazer parte da vida de vocês! “Um verdadeiro amigo é mais chegado que um irmão (Provérbios 18:24)”.

Agradeço a amiga que a ciência me deu Leticia Pontes! Menina especial em minha vida! Obrigada por estar sempre disposta a me ouvir e estar comigo!

Agradeço aos meus amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino pelo companheirismo e amizade ao longo desses anos! Aíslan, Sucesso e Shirley, Tamo junto sempre!

Aos amigos do Laboratório de Química de Produtos Naturais por toda ajuda e pelo fornecimento dos extratos, em especial a Professora Anne Lígia Dokkedal e ao querido Léo!

Agradeço ao querido amigo Thiago José Dionízio do Laboratório de Farmacologia e Fisiologia da USP - Bauru, pelos conselhos e ajuda sempre. Todo laboratório merece ter um “Thiago”. Você foi fera!

Aos funcionários da UNESP de Bauru, em especial ao bioterista Thiago Tozi.

Aos funcionários da sessão de Pós-graduação pelas informações e disponibilidade em ajudar sempre!

A FAPESP pelo apoio financeiro concedido (Processo nº 2013/10708-0).

Tenho certeza de que esse trabalho não seria possível sem a participação de seres tão especiais: meus animais de experimentação. Por isso, gostaria de agradecer-los e mesmo parecendo hipócrita, me desculpar. Finalizo esse trabalho, com a certeza de que prezei e dei o meu melhor para garantir dignidade e amenizar o sofrimento dessas vidas. Meu eterno respeito e gratidão!

Obrigada a todos que direta ou indiretamente participaram e colaboraram para a realização desse sonho! Que Deus abençoe a cada um de vocês e retribua em dobro tudo o que desejaram e fizeram por mim!

Obrigada!

“Poís Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.”

Romanos 11:36

Lista de Abreviaturas

AC	Acarbose
ACC	AcetilCoA-Carboxilase
AICAR	5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AKT	Serina Treonina Cinase
ATP	Adenosina Trifosfato
AMPK	AMP- ativado por proteína cinase
BH	<i>Bauhinia holophylla</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM tipo 1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM tipo 2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose do tipo 4
GF	Glicogênio fosforilase
GS	Glicogênio Sintetase
GSK3 β	Glicogênio Sintase Cinase 3 β
ipGTT	Teste de tolerância à glicose intraperitoneal
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
IRS 1	Substrato do Receptor de Insulina tipo 1
IRS 2	Substrato do Receptor de Insulina tipo 2
IRS 3	Substrato do Receptor de Insulina tipo 3
IRS 4	Substrato do Receptor de Insulina tipo 4
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mRNA	RNA mensageiro

PI3K	Fosfatidilinositol3cinase
PEPCK	Fosfoenolpiruvatocarboxicinase
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido dismutase
SH 2	Homólogo SH 2

Lista de Figuras

Figura 1: Secreção de insulina pelas células β pancreáticas.

Figura 2: Sinalização de insulina em tecidos periféricos.

Figura 3: Metabolismo de glicose mediado pela insulina.

Figura 4: Glicemia de jejum dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou com o extrato de *B. holophylla* na dose de 200 e 400 mg/kg durante 14 dias.

Figura 5: Teste de tolerância dos animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou com o extrato de *B. holophylla* na dose de 200 e 400 mg/kg durante 14 dias.

Figura 6: Cromatograma analítico do extrato EtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla* obtido por HPLC-DAD extraído em 254 nm

Figura 7: Expressão de mRNA total dos genes IRS-1 (4A), PI3K (4B), AKT (4C), GSK3 β (4D) e GS (4E) em fígado) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 8: Expressão proteica da enzima GSK3 β em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 9: Expressão de mRNA total dos genes GCK (A) e GF (B) em fígado) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 10: Expressão de mRNA dos genes G6Pase (A) e PEPCCK (B) em fígado) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 11: Expressão proteica das enzimas G6Pase (A) e PEPCCK (B) em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 12: Expressão proteica da AMPK em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 13: Expressão de mRNA dos genes IR (A), PI3K (B), AKT (C) e GLUT4 (D) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 14: Expressão de mRNA do gene GS) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 15: Expressão proteica da PI3K (A), AKT (B) e GLUT4 (C) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 16: Expressão proteica da AMPK em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 17: Expressão proteica da PTP1B em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos.

Figura 18: Avaliação da atividade inibidora do extrato de *B. holophylla* para a enzima α -amilase *in vitro*.

Figura 19: Avaliação da atividade inibidora do extrato de *B. holophylla* para a enzima α -glucosidase *in vitro*.

Figura 20: Teste de tolerância ao amido em camundongos normoglicêmicos tratados com salina ou com extrato de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.

Figura 21: Teste de tolerância à maltose em camundongos normoglicêmicos tratados com salina ou com extrato de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg.

Figura 22: Mecanismo da ação hipoglicemiante do extrato de *B. holophylla* em camundongos diabéticos.

Resumo

Resumo

CAMAFORTE, N.A.P. Investigação dos mecanismos de ação do extrato bruto de *Bauhinia holophylla* em fígado e músculo esquelético em camundongos diabéticos tipo 1 induzidos por estreptozotocina. 2017. 97p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

O *Diabetes mellitus* (DM) é conhecido como uma doença metabólica caracterizada pela hiperglicemia de jejum levando a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Nos últimos anos houve um aumento de pesquisas envolvendo plantas medicinais no tratamento de muitas doenças, inclusive DM, no entanto, são poucos os dados que elucidam o mecanismo de ação dessas plantas hipoglicemiantes. O objetivo do presente trabalho foi verificar o mecanismo de ação do extrato bruto de *B. holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina, avaliando expressão gênica e proteica da via de sinalização de insulina em tecidos periféricos como fígado e músculo esquelético, bem como avaliar a atividade inibitória para as enzimas α -amilases e α -glicosídeos em testes *in vitro* e *in vivo*. O tratamento com o extrato de *B. holophylla* promoveu a diminuição da expressão gênica e proteica das enzimas G6Pase, PECK e Glicogênio Fosforilase e aumento da expressão proteica AMPK em fígado. Em músculo, promoveu o aumento da expressão das proteínas PI3K, AKT e GLUT4 e diminuição da expressão da PTP1B. Além disso, o extrato mostrou potente atividade inibitória para as enzimas α -amilases e α -glicosídeos *in vitro* e *in vivo*. Portanto, conclui-se que a atividade hipoglicemiante do extrato de *B. holophylla* foi através da ativação da via da glicogênese e inibição da gliconeogênese e glicogenólise em fígado, ativando as vias dependente e independente de insulina para captação de glicose em músculo esquelético e inibindo a absorção de glicose no intestino.

Abstract

Abstract

CAMAFORTE, N.A.P. Investigation of mechanisms of action of crude extract of *Bauhinia holophylla* in liver and muscle of diabetic STZ-induced mice. 2017. 97p. Thesis (PhD) – Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University, Botucatu, 2016.

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease characterized by chronic hyperglycemia (equal or higher than 126 mg/dL) resulting in alterations on fatty, protein and carbohydrate metabolism. In the past years many researches of medicinal plants area to treat a great sort of diseases, including DM was done, however, there are few data with the elucidation of mechanism of action of these medicinal plants. The aim of this study was to verify the hypoglycemic mechanism of action of *B. holophylla* in streptozotocin diabetic mice, evaluating key-proteins and gene expression from insulin pathway in muscle and liver, and the inhibitory effect for the α -amylases and α -glucosidases in vitro and in vivo tests. We also tested the hypoglycemic effect of fractions and the isolated compound by the crude extract of *B. holophylla*. The treatment with the extract of *B. holophylla*, the gene and protein expression analysis showed a decrease of G6Pase, PEPCK and increase of AMPK and GSk3 β in liver. In muscle, the treatment was able to increase the PI3K, AKT and GLUT4 and decrease of PTP1B protein expression. Beyond this, the extract showed potent inhibitory effect against α -amylases and α -glucosidases in *in vitro* and *in vivo* tests. In conclusion, the mechanism of hypoglycemic action of *B. holophylla* was activating glycogenesis and inhibiting gluconeogenesis and glycogenolysis in liver, activating dependents and independent insulin pathway for glucose intake in muscle and decreasing the glucose absorption in intestine.

Sumário

Sumário

1. Introdução.....	23
1.1. Insulina	24
1.2. Metabolismo de glicose	25
1.3. Diabetes mellitus	30
1.4. Diabetes mellitus experimental	32
1.5. Fármacos utilizados no tratamento do <i>Diabetes mellitus</i>	34
1.6. Plantas medicinais no tratamento do <i>Diabetes mellitus</i>	35
1.7. Cerrado brasileiro e Gênero Bauhinia	39
2. Objetivos.....	42
2.1. Objetivo Geral	43
2.2. Objetivos específicos.....	43
3. Materiais e métodos.....	44
3.1. Coleta do material vegetal	45
3.2. Obtenção dos extratos.....	45
3.4. Animais.....	46
3.5. Indução do Diabetes	46
3.6. Divisão dos grupos	47
3.7. Extração proteica e Western Blotting.....	47
3.8. Extração de RNA.....	48
3.9. Síntese de cDNA	49
3.10. Análise da expressão gênica utilizando PCR quantitativo em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR).....	49
3.11. Avaliação da atividade inibitória do extrato de <i>B. holophylla</i> em α - glicosidades in vitro.....	50
3.11.1. Ensaio Enzimático para α -Glicosidades.....	50
3.11.2. Determinação da IC50.....	51
3.11.3. Ensaio de reversibilidade	52
3.12. Teste de absorção de amilase e maltose em camundongos normoglicêmicos	52
3.13. Análise dos resultados	52
4. Resultados.....	53
5. Discussão	72
6. Conclusão	86
7. Referências bibliográficas	88

Introdução

1. Introdução

1.1. Insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico importante para a homeostase da glicose e por isso, está intimamente ligada ao *Diabetes mellitus*. Além de controlar a glicemia, está relacionada ao crescimento e diferenciação celular, estimular a lipogênese e a síntese de proteínas e inibir a lipólise e a degradação proteica em fígado e adipócitos (Carvalheira, Zechin & Saad, 2002). Este hormônio foi descoberto em 1922 por Banting e Best e após isso, a ciência apresentou um grande avanço, pois até então, pouco se sabia à respeito do metabolismo dos nutrientes (Joshi, Parikh & Das, 2007).

O gene da insulina codifica a precursora chamada pré-pró-insulina (inativa) com 110 aminoácidos. Após a remoção de 23 aminoácidos e a formação de três ligações dissulfeto, a pró-insulina é clivada pelas células β pancreáticas. Posteriormente, a remoção do peptídeo C a insulina madura é então clivada, constituindo-se de duas cadeias peptídicas, A e B, a primeira com 21 aminoácidos e a segunda com 30 (Carvalheira, Zechin & Saad, 2002).

A insulina está estocada em grânulos no interior das células β e a sua secreção ocorre em resposta ao aumento de glicose circulante. Os receptores dos transportadores de glicose 2 (GLUT 2) presentes nas células β captam a glicose que é então oxidada pela enzima glicoquinase, que age como um sensor da glicose na célula β . Em condições de homeostase de glicose (abaixo de 90 mg/dL), não ocorre estímulo para a secreção de insulina e os canais K^+ dependentes de ATP permanecem abertos, favorecendo a entrada de íons K^+ , fazendo com que a membrana da célula β permaneça com potencial negativo. Com o aumento da glicose plasmática, a glicose é captada para o interior da célula, oxidada pela glicoquinase, fazendo com que haja liberação de ATP e a fração ATP/ADP aumentada leva ao fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP causando a despolarização da membrana celular e abertura dos canais Ca^{+2} , sensíveis a voltagem levando ao aumento da concentração de Ca^{+2}

no interior da célula e por último, estimulando a exocitose do hormônio pelos grânulos de insulina (Fig. 1) (Fu, Gilbert & Liu, 2013).

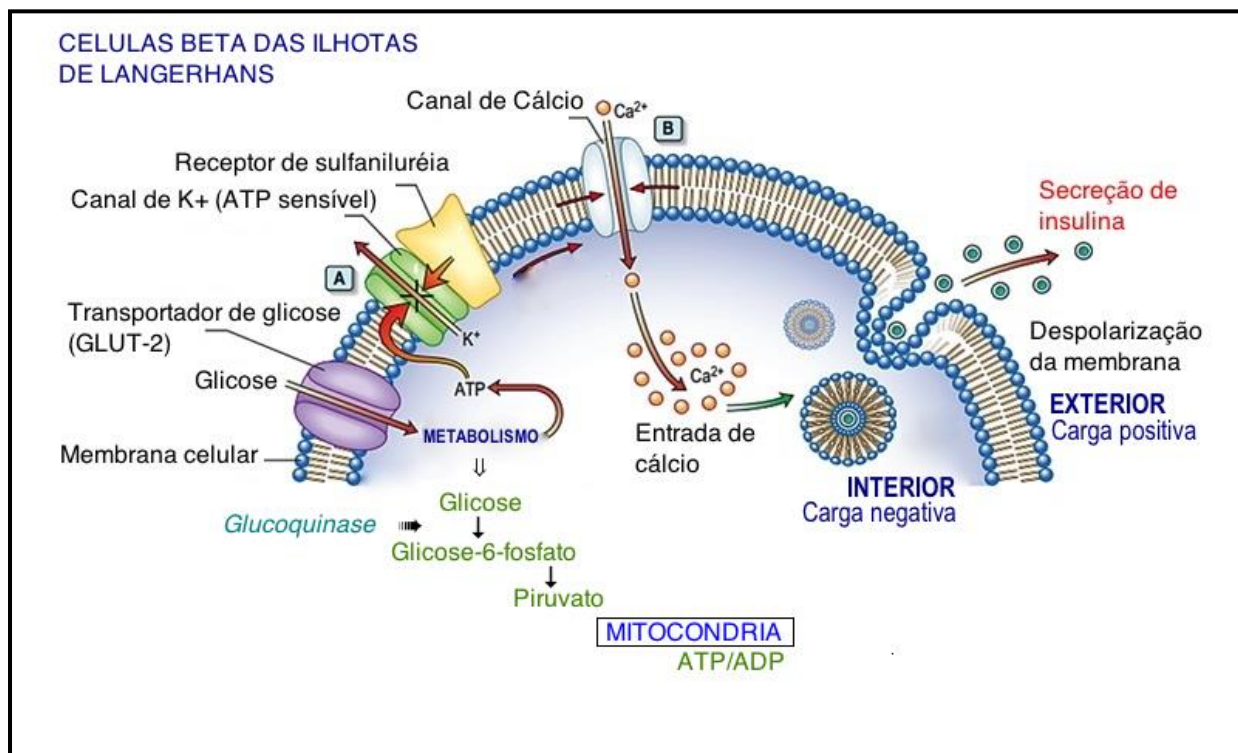


Figura 1. Secreção de insulina pelas células β . Glicose entra na célula β através do GLUT2 e é oxidada pela glicocinase levando ao aumento da fração ATP/ADP que causa o fechamento dos canais de potássio causando a despolarização da membrana celular e fechamento dos canais de cálcio e influxo de Ca^{+2} e então, levando a exocitose de insulina para a corrente sanguínea.

1.2. Metabolismo de glicose

As células do organismo necessitam de energia para realizar inúmeras reações metabólicas e a glicose tem participação crucial no fornecimento de energia ao organismo através de processos como a glicólise. O metabolismo de açúcares se inicia com a ingestão e absorção de alimentos. A glicose ingerida através da hidrólise de carboidratos dos alimentos pode ser estocada em diferentes formas em tecidos como fígado, tecido adiposo e muscular. Processos como glicogênese (estocagem de glicose na forma de glicogênio em fígado e

músculo) e lipogênese (estocagem de glicose como gordura no tecido adiposo) são mediados pela insulina em resposta ao aumento da glicose circulante (Chang *et al.*, 2004).

A regulação do metabolismo da glicose, mediado pela insulina, ocorre, entre outros mecanismos, através do aumento da translocação de vesículas contendo transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) do citoplasma para a membrana plasmática do adipócito e célula muscular esquelética, promovendo aumento da captação de glicose nesses tecidos. Além disso, a insulina promove aumento da fosforilação intracelular da glicose, aumentando a produção de glicose-6-fosfato, que, no fígado e músculo, pode ser convertida em glicogênio pelo processo de glicogênese, e então estocada (Carvalheira, Zechin & Saad, 2002).

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação ao seu receptor específico (Fig.2), localizado na membrana plasmática e que apresenta atividade cinase, composto por duas subunidades α e duas subunidades β , sendo que a subunidade α inibe a atividade da β . Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos vertebrados, variando de 40 receptores em um eritrócito a 200.000 em cada célula adiposa e hepática (Haber, 2001). A ligação da insulina à subunidade α (extracelular) permite que a subunidade β (intracelular) adquira atividade cinase, levando a uma mudança na sua formação e a sua autofosforilação, aumentando ainda mais a atividade do receptor que, em seguida, promove a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS). Até o momento, foram descritas dez isoformas de substratos de receptor de insulina, sendo quatro as proteínas pertencentes à família dos IRS (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4). As demais incluem proteínas como Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS (Carvalheira, Zechin & Saad, 2002; Haber, 2001).

Após o estímulo pela insulina, a proteína fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) é ativada pelo IRS-1. Sabe-se que existe uma estreita ligação entre os IRS-1 e 2 e a PI3K, proteína que contém dois sítios de ligação SH2 e SH3 e é uma serina/treonina cinase importante na mitogênese, diferenciação celular e captação da glicose. O IRS-1, quando fosforilado em

tirosina, pode associar-se ao domínio SH2 da subunidade regulatória da PI3K, levando à ativação de uma cascata de eventos que resulta na estimulação do transporte de glicose para o interior da célula (Ruderman *et al.*, 1990).

A sinalização de insulina constitui-se de duas distintas vias: Akt/GSK3 β e Ras/ERK. A primeira é responsável por mediar os efeitos glicotrópicos, incluindo a estimulação da captação da glicose periférica e produção de glicogênio e lipídeos, enquanto que a via Ras/ERK media os efeitos proliferativos ou mitogênicos (Liu *et al.*, 2010).

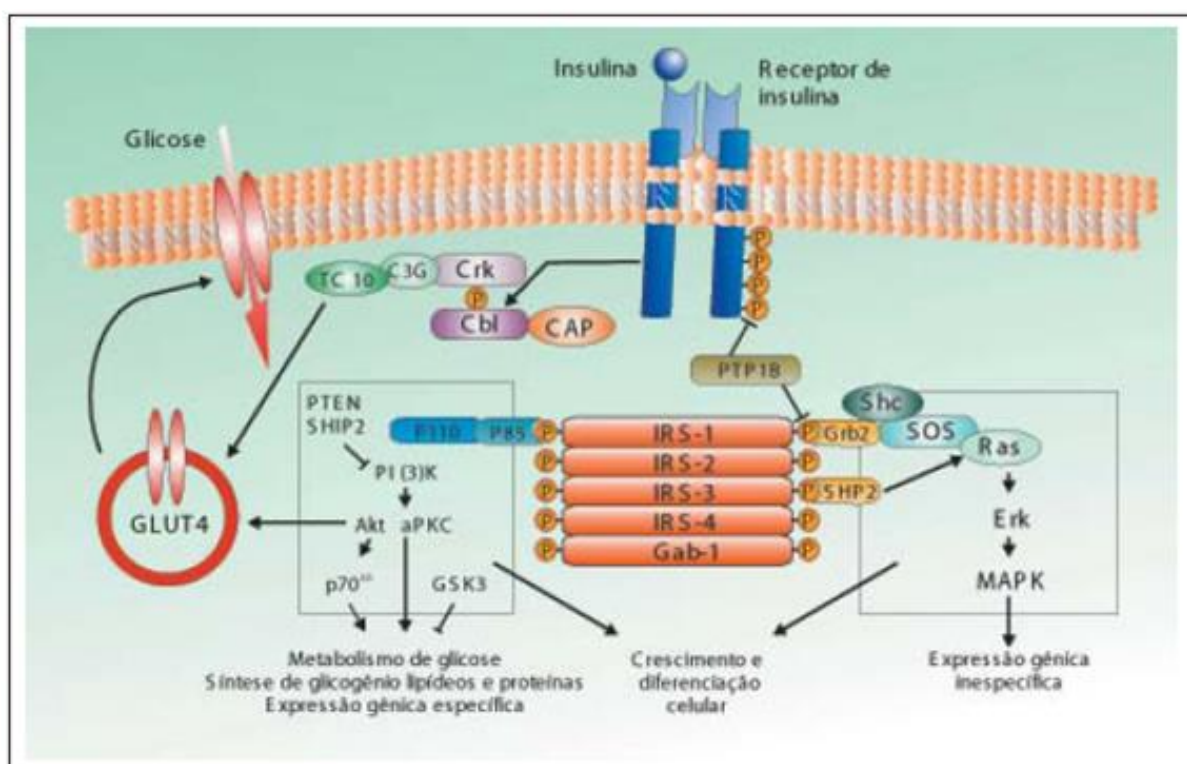


Figura 2. Sinalização da insulina em tecidos periféricos. Com a ligação da insulina, o receptor de insulina se autofosforila catalisando a ativação de proteínas como a IRS, Shc e Cbl. Após a fosforilação causada pela ativação do receptor de insulina, essas proteínas se ligam à outras moléculas resultando na ativação de vias de sinalização como a via da PI3K, a cascata da MAPK e a ativação do TC10 via CAP/Cbl. Tais vias são responsáveis por regular o transporte de glicose, síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas. (Retirado de Carvalheira, Zechin & Saad, 2002).

No fígado, a insulina é responsável por mediar efeitos como oxidação da glicose (glicólise), bem como estimular a sua estocagem na forma de glicogênio (glicogênese) e inibir

a degradação de glicogênio (glicogenólise) para liberação da glicose na corrente sanguínea, além de inibir a gliconeogênese, que é a formação de glicose a partir de compostos não carboidratos, como aminoácidos, lactato e glicerol, em condições de jejum (Fig. 3) (Hazarika *et al.*, 2012; Prabhakar & Doble, 2008).

A insulina desempenha papel fundamental no processo da síntese de glicogênio em vários tecidos e envolve a participação de diversas enzimas, como a glicogênio sintase (GS), a enzima mais importante deste processo. O GS quando fosforilada através da ação da glicogênio-sintase-quinase3 (GSK-3), torna-se inativa. A insulina é responsável pela fosforilação da GSK-3, impedindo assim a inativação da GS, dando o passo inicial para a produção do glicogênio, através da ativação da PI3K e posteriormente da AKT. A AKT pode fosforilar e inativar a GSK-3, reduzindo, portanto, a fosforilação da GS e aumentando a produção de glicogênio (Akram *et al.*, 2011; Hazarika *et al.*, 2012).

A glicogenólise é a quebra dos estoques de glicogênio para formação de glicose e ocorre quando o organismo passa por longos períodos de jejum e é realizada principalmente pelas enzimas glicogênio fosforilase (GF) e a hexoquinase. Tal processo é importante para a manutenção da homeostase da glicose enquanto dormimos, por exemplo. Em condições normais, a insulina age inibindo essas enzimas. No entanto, em pacientes com DM, devido à ausência da insulina, ocorre aumento da atividade dessas enzimas, levando à degradação de glicogênio e consequente aumento de glicose circulante (Petersen *et al.*, 1998).

Além da glicogenólise, nosso organismo possui outro mecanismo para manutenção da glicose durante o jejum prolongado, a gliconeogênese ou neoglicogênese. A atividade de algumas enzimas é extremamente importante no processo de gliconeogênese, como a fosfoenolpiruvato carboxicinas (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6P). A insulina é o principal hormônio inibidor deste processo e age através da supressão da expressão dos genes das enzimas PEPCK e G6P. A primeira catalisa a reação de ácido oxalacético em

fosfoenolpiruvato, enquanto a G6P é responsável pela produção de glicose livre a partir da glicose-6-fosfato. A expressão dos genes para PEPCK e G6P é induzida pelo glucagon durante períodos de jejum, por glicocorticoides durante períodos de estresse ou pelas catecolaminas durante o exercício (Barthel & Schmoll, 2003; Govorko *et al.*, 2007).

Na célula muscular e no adipócito, a insulina é essencial para promover a captação de glicose através do estímulo da translocação do GLUT 4 para a membrana celular, sua utilização como fonte energética e estocagem na forma de glicogênio. Nesses tecidos a insulina pode estimular ainda a lipogênese e a síntese de proteínas e inibir a lipólise (quebra de triglicerídeos) e proteólise (Carvalho, Zechin & Saad, 2002)

A translocação é a responsável pelo aumento da captação de glicose, principalmente no estado pós-prandial, devido a maiores concentrações de insulina e ao gradiente de glicose favorecido (Machado, 1998). Sabe-se que a captação de glicose via ativação do GLUT4 se dá através de duas vias distintas: PI3K/AKT (via dependente de insulina) ou através da contração muscular via ativação da AMP-activated protein kinase (AMPK) (independente de insulina) (Xu *et al.*, 2015).

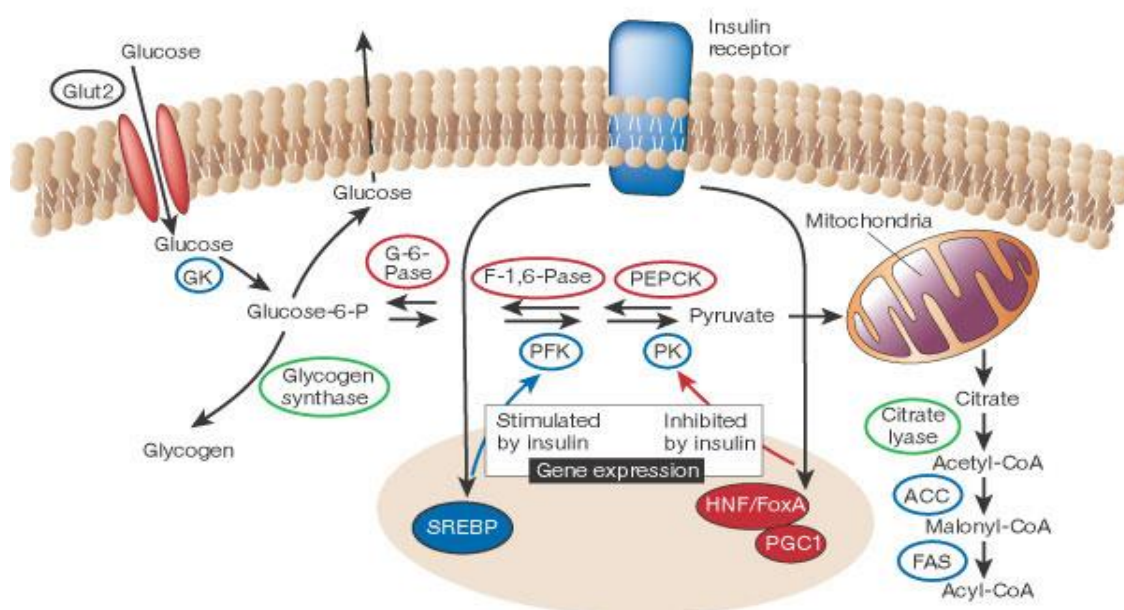


Figura 3. Regulação da absorção da glicose em fígado pela insulina. Após ser absorvida pelo transportador de glicose 2 (GLUT2), a glicose pode ser oxidada (glicólise) para geração de energia ou ser estocada na forma de glicogênio (glicogênese). Durante jejum prolongado o fígado utiliza de compostos que não são carboidratos para formação de glicose endógena e manutenção da homeostase da glicose (gliconeogênese) ou realiza a degradação do glicogênio estocado para liberação de glicose na corrente sanguínea (glicogenólise) (Bryant *et al.*, 2002).

A AMPK foi primeiramente descrita como uma enzima ativada por alterações na taxa ATP/AMP que poderia aumentar a geração celular de ATP (oxidação de ácidos graxos) ou diminuir seu uso através de síntese de ácidos graxos, proteínas e triglicerídeos. A sua ativação é capaz de regular processos como transporte de glicose, síntese de lipídeos e proteína, e metabolismo energético, além de eventos fisiológicos como, crescimento e proliferação celular, função mitocondrial e biogênese e fatores ligados a RI. Além da contração muscular, existem fármacos, como metformina e AICAR, que agem estimulando a ativação dessa proteína para aumentar a captação de glicose e consequentemente auxiliar no tratamento de DM (Ruderman *et al.*, 2014).

A sinalização da insulina é de suma importância para a manutenção da homeostase da glicose. Proteínas fosfatases em tirosinas (PTPs) são consideradas reguladores negativos do Receptor de insulina (IR), sendo que a PTP1B (Proteína tirosina fosfatase 1B) é a principal proteína dessa família. A PTP1B é o principal regulador negativo do receptor de insulina envolvido na regulação da sensibilidade à insulina e da leptina e está localizado na face citoplasmática do retículo endoplasmático (ER). Um aumento na expressão dessa proteína leva a uma diminuição da sensibilidade à insulina pelo IR (Bakke & Haj, 2015; Gonzalez-Rodrigues *et al.*, 2010). Devido a isso, inibidores dessa proteína tem sido alvo terapêutico para o tratamento de muitas doenças, principalmente obesidade e DM tipo 2.

1.3. Diabetes mellitus

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica de jejum (maior ou igual a 126 mg/dl) que leva a alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. Até o ano de 2014, existiam cerca de 422 milhões de diabéticos no mundo e estima-se que até o ano de 2040, esse número passará para 642 milhões de adultos diabéticos (WHO, 2016). O DM está entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais, 1,5 milhão de mortes até o ano de 2012, sendo que 43% dessas mortes ocorreram em pessoas com menos de 70 anos devido ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e, apesar dos crescentes estudos a respeito dessa doença, ainda não foi possível controlar de fato suas complicações (WHO, 2016).

De acordo com a classificação proposta pela Associação Americana de Diabetes (ADA, 2006), o DM é classificado em Tipo 1, Tipo 2, outros tipos específicos e Diabetes gestacional. O DM tipo 1 representa de 5 a 10% de todos os casos de diabetes e é resultado de destruição autoimune das células β pancreáticas pelos linfócitos T- $CD4^+$, $CD8^+$, auto anticorpos e por macrófagos, impedindo assim a secreção da insulina. Afeta principalmente crianças e jovens que necessitam da administração diária de insulina exógena para a manutenção da homeostase da glicemia (Szkudelski, 2012). Alguns indivíduos diabéticos são classificados como tipo idiopáticos, pois não possuem evidências de autoimunidade para o desencadeamento da doença (ADA, 2011).

O DM 2 é mais frequente, correspondendo cerca de 95% dos casos, e tende a se manifestar em indivíduos adultos, com idade superior a 40 anos que possuem uma dieta inadequada associado a vida sedentária (Dias *et al.*, 2007). É caracterizado por resistência à insulina (RI) e relativa deficiência na sua produção. A hiperglicemia se desenvolve lentamente, pois esse defeito na ação da insulina é compensado inicialmente pelo aumento na sua secreção. No entanto, com o passar do tempo, se não houver tratamento adequado, esse

aumento na secreção leva a uma progressiva exaustão e consequente morte das células β (Szkudelski, 2012).

Existe, ainda, outro tipo, pouco conhecido, mas muito parecido com o DM tipo 2, o Diabetes Gestacional. O DM gestacional é causado por mudanças hormonais e metabólicas durante a gravidez associado a fatores genéticos e ambientais. Estudos indicam que a produção de hormônios pela placenta e outros fatores relacionados à gravidez contribuem para a resistência à insulina durante o período gestacional e assim como no DM tipo 2, a obesidade está intimamente relacionada, juntamente com histórico familiar. Como os hormônios femininos voltam ao normal após a gravidez, esse tipo de diabetes desaparece na maioria dos casos, no entanto, mulheres que tiveram diabetes durante a gravidez, são mais propensas a desenvolver DM tipo 2 futuramente (ADA, 2011).

Além do tipo 1 e 2, existem ainda outros tipos de diabetes causados por uma variedade de causas como: mutações genéticas que afetam a célula β , insulina e sua ação, doenças no pâncreas ou outras doenças genéticas, como Síndrome de Down, podem levar ao desenvolvimento do DM (ADA, 2011).

Existem diversos tratamentos para o DM como: insulinoterapia (sintética) e administração de fármacos alopáticos como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da α -glicosidase e α -amilase (ascarbose, miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto. No entanto estes medicamentos possuem muitos efeitos adversos (Vareda *et al.*, 2014).

1.4. Diabetes mellitus experimental

Atualmente, existem na literatura muitos modelos de DM experimental para o melhor entendimento acerca dos mecanismos e consequências do DM. Tais modelos mimetizam tanto as causas quanto os sintomas dessa doença em animais. O diabetes

experimental pode ser conseguido através da indução química ou ser de natureza espontânea (alterações genéticas) (Silva & Nogueira, 2015; Szkudelski, 2001).

As substâncias mais utilizadas para indução química do DM são Aloxana e Estreptozotocina (STZ) e ocorre após destruição seletiva das células β pancreáticas. A STZ é um glicosídeo nitrosuréia isolado de *Streptomyces achromogenes* e apresenta efeito citotóxico direto nas células β de diversas espécies de animais, entre eles camundongos e ratos. O seu efeito diabetogênico inicia-se pela sua entrada na célula por meio do transportador de glicose (GLUT2), sendo, portanto, competitivo da glicose. Após a entrada na célula β , a STZ causa danos ao DNA por meio da formação de óxido nítrico (NO), causando então a morte das células β por necrose. Apenas duas horas após a injeção da STZ já podemos observar o aumento da glicemia, devido à diminuição da síntese de insulina e após seis horas, hipoglicemia devido à destruição das células β e liberação maciça de insulina que estavam estocadas nos grânulos. A hiperglicemia é estabilizada após pelo menos sete dias da indução (Kirsten, 2010).

A aloxana, um derivado pirimídico, exerce sua ação diabetogênica tanto quando administrada intravenosa, intraperitoneal ou subcutaneamente e a dose requerida depende da espécie do animal, via de administração e estado nutricional. A entrada da aloxana, assim como a STZ, ocorre através da sua captação pelo GLUT2 e o seu mecanismo de ação tem sido muito estudado e sabe-se causa a morte das células β por meio da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Lerco *et al.*, 2003). Apesar de ser amplamente utilizada, estudos têm mostrado que a sua seletividade para de ação não é muito satisfatória e além disso, existem muitos problemas relacionados a sua instabilidade química e rápida metabolização o que torna difícil a replicação de metodologia (Szkudelski, 2001). Por isso, para a indução química do DM, a estreptozotocina é mais confiável e utilizada.

Além do DM induzido quimicamente, existem os modelos de diabetes espontânea. Tais modelos são muito utilizados por mimetizar a causa do DM em humanos através de animais com pré-disposição genética e defeitos imunológicos. Para o DM tipo 1, o modelo mais utilizado é o NOD (*Non Obese Diabetic*) e ratos BB (*Biobreanding*). Os dois modelos apresentam hipoinsulinemia, hiperglicemia (360 a 540 mg/dl), glicosúria, perda de peso, polidipsia e polifagia aos 3 meses de idade. Camundongos NOD exibem autoimunidade espontânea que causa diabetes por meio da destruição das células β causado por uma infiltração de leucócitos nas ilhotas e consequentemente insulite (Kirsten, 2010).

Existem diversos modelos para o estudo do DM tipo 2, entre eles os mais conhecidos e utilizados são: os camundongos ob/ob e db/db e ratos Zucker. Os camundongos ob/ob desenvolvem obesidade através de uma mutação gênica no gene ob, que é um codificador do gene leptina. Já os camundongos db/db e os ratos Zucker apresentam mutações no gene codificador para o receptor de leptina. Sabe-se que este hormônio está intimamente ligado ao equilíbrio e uso de energia pelo organismo além de inibir a fome. Tanto os camundongos ob/ob quanto os db/db e ratos Zucker apresentam portanto, uma resistência hipotalâmica à leptina desenvolvendo obesidade (Negrão & Licinio, 2000; Cesaretti & Kohlmann – Junior, 2006).

1.5. Fármacos utilizados no tratamento do Diabetes mellitus

Como dito anteriormente, o tratamento do DM envolve a administração de fármacos hipoglicemiantes como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da α -glicosidase (acarbose e miglitol), que podem ou não ser utilizadas juntamente com a insulina sintética (Hsu *et al.*, 2009).

Sulfoniluréias agem estimulando a liberação de insulina diretamente pelo pâncreas. O mecanismo de ação das biguanidas ainda não está totalmente esclarecido, mas parece

envolver a diminuição da produção hepática da glicose (gliconeogênese), absorção intestinal de glicose, diminuição do apetite e aumento da captação da glicose pelo músculo e tecido adiposo (ativação da AMPK). Inibidores da α -amilase e α -glicosidase, como acarbose e voglibose, são pseudo oligossacarídeos, inibidores competitivos das enzimas responsáveis pela quebra de amido, dextrina, maltose e sacarose em monossacarídeos absorvíveis. Esses inibidores diminuem, mas não impedem a absorção de glicose, reduzindo assim a hiperglicemia pós-prandial (Andrade-Cetto *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2012).

O principal objetivo dos fármacos no tratamento do DM é, inicialmente, aumentar o tempo de vida do paciente bem como aliviar os sintomas da doença e, posteriormente, diminuir os riscos de desenvolvimento das complicações secundárias causadas pelo DM aumentando assim, a longevidade do paciente. Esses fármacos podem ser prescritos juntamente com uma dieta adequada e mudanças no estilo de vida do paciente como a inclusão de exercícios físicos diariamente, principalmente para pacientes com DM tipo 2 (Bastaki, 2005). Infelizmente, todos esses fármacos possuem efeitos adversos tais como ganho de peso, hipoglicemia, edemas, distúrbios gastrointestinais e indução de resistência à insulina (Vasconcelos *et al.*, 2011).

1.6. Plantas medicinais no tratamento do Diabetes mellitus

Plantas medicinais e produtos naturais são utilizados no tratamento do DM e muitas outras doenças desde os primórdios da humanidade na medicina popular e tradicional, possuindo benefícios como eficiência, segurança, acessibilidade e aceitabilidade por parte dos pacientes. Nos últimos anos, têm sido alvo de pesquisas científicas para comprovação dos seus efeitos e melhor entendimento dos mecanismos de ação para o tratamento de doenças (Kumar *et al.*, 2012).

A ação medicinal das plantas se deve principalmente à presença dos chamados metabólitos secundários que estão envolvidos em processos de defesa e proteção da planta, como flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos entre outros (Mazid *et al.*, 2011).

Os flavonoides são muito estudados devido a sua ação farmacológica em diversas doenças. Compõem uma classe de substâncias de origem vegetal e sua síntese não ocorre na espécie humana. Constituem substâncias aromáticas com 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico, dois anéis aromáticos (Anéis A e B) e um heterociclo oxigenado (Anel C). Do ponto de vista farmacológico, possuem propriedades que os permitem agir sobre muitos sistemas. São encontrados em frutos, raízes, folhas e caules (Negri, 2005) e possuem efeitos hipoglicemiantes e antidiabéticos (Morikawa, 2007; Udayakumar *et al.*, 2009).

A atividade hipoglicemiante de plantas medicinais pode ocorrer através da sua habilidade em restaurar a função pancreática resultando em aumento da liberação de insulina, da inibição da absorção intestinal de glicose, diminuindo a glicemia pós-alimentar, ou ainda por facilitar os processos metabólicos dependentes de insulina, sendo que em alguns casos seus efeitos são similares ao dos fármacos convencionais (Malaviya *et al.*, 2010).

Existem na literatura trabalhos recentes envolvendo plantas medicinais com propriedades hipoglicemiantes com algum grau de elucidação de seus mecanismos de ação. Nos últimos anos, os pesquisadores têm buscado respostas em nível molecular para avaliação da expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização de insulina e nos processos de armazenamento e captação de glicose. Kumar *et al.* (2011) testaram o efeito do extrato etanólico das folhas de *Allangium lamarkii*, durante 14 dias nas doses de 250 e 500 mg/kg, em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Foi constatada uma redução significativa da glicemia com a dose mais elevada, além da reversão do quadro hiperlipidêmico, diminuição dos níveis de triglicérides, colesterol total e LDL e aumento dos níveis de HDL. A

administração do extrato também resultou no aumento dos níveis das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), importantes enzimas antioxidantes.

A administração oral do extrato metanólico de *Passiflora incarnata* Linn., durante 15 dias na dose de 200 mg/kg, reduziu significativamente os níveis da glicose em camundongos diabéticos, provavelmente por meio da estimulação da síntese de glicogênio hepático, além de aumentar o peso corpóreo dos animais diabéticos tratados com o extrato, bem como melhorar o perfil lipídico quando comparado aos animais diabéticos tratados com salina (Gupta *et al.*, 2012).

Estudos de Sharma *et al.* (2008) demonstraram que o extrato rico em flavonoides das sementes de *Eugenia jambolona* (Myrtaceae), apresentou atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica em animais diabéticos. A administração do extrato aumentou os níveis de glicogênio hepático e muscular, além de aumentar os níveis de insulina em estudos *in vivo* e *in vitro*. Ocorreu também aumento da expressão da enzima glicocinase e diminuição da expressão das enzimas G6P e PECK envolvidas nos processos de glicogênese e gliconeogênese. Houve também aumento na expressão da proteína transportadora de glicose GLUT4 em tecido adiposo e muscular.

Bansal *et al.* (2012) avaliaram a atividade hipoglicemiante da fração rica em flavonoides do extrato de *Pilea microphylla* e, após tratamento de 28 dias, o extrato administrado na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente os níveis glicêmicos de jejum em animais diabéticos, bem como diminuir os níveis de triglicérides, colesterol total e aumentar os níveis das enzimas antioxidantes como GSH, CAT e SOD, podendo diminuir portanto a suscetibilidade às complicações secundárias do DM.

Baviloni *et al.* (2010) elucidaram o provável mecanismo de ação da atividade hipoglicêmica do extrato da casca do caule da *Vatairea macrocarpa*, que parece estar ligado à estimulação da via de sinalização da insulina em tecidos periféricos, principalmente músculo

esquelético e tecido adiposo (aumento de captação de glicose) e fígado (aumento da glicogênese). Houve aumento nos níveis da proteína IR e na fosforilação da proteína AKT no músculo extensor longo dos dedos e no tecido adiposo de animais diabéticos tratados com o extrato de *V. macrocarpa*, sugerindo aumento na translocação de GLUT-4. Ocorreu também diminuição dos níveis da proteína hepática PEPCCK, o que pode estar relacionado à inibição da neoglicogênese, contribuindo para a redução da glicemia dos animais tratados.

Estudos em nosso laboratório conduzidos por Vareda *et al.* (2014) demonstraram que o tratamento com o extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600 mg/kg em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina diminuiu a glicemia de jejum e melhorou a tolerância à glicose após 14 dias de tratamento. Além disso, estudos em níveis moleculares analisando a via da sinalização de insulina mostraram que a ação hipoglicemiante do extrato foi através da ativação da via produtora de glicogênio (glicogênese), via esta, comprometida pelo DM.

Estudos com plantas medicinais e seus compostos isolados têm mostrado potente atividade inibitória para enzimas de α -glicosidase, importantes para a absorção de glicose intestinal. Sama *et al.* (2012) testaram a atividade inibitória do extrato de *Cissus arnottiana* em α -amilase e α -glicosidase e viu-se que na dose de 2,95 mg/mL e 2,81 mg/mL, respectivamente, o extrato foi capaz de inibir 50% a atividade de tais enzimas. A habilidade das plantas em inibir a absorção intestinal de glicose pós prandial têm mostrado ser um importante alvo terapêutico para o controle do DM (Dang *et al.*, 2015; Picot *et al.*, 2014).

Como dito anteriormente e citado por alguns exemplos citados acima, nos últimos anos houve um crescimento significativo do estudo acerca dos efeitos de plantas medicinais sobre doenças crônicas, inclusive DM. No entanto, é necessário que se concentre esforços especialmente para a elucidação dos possíveis mecanismos de ação desses fármacos, estudos que são primordiais para o melhor entendimento do modo como modulam o metabolismo e a homeostase glicêmica.

1.7. Cerrado brasileiro e Gênero *Bauhinia*

O Cerrado brasileiro apresenta uma área de cerca de dois milhões de quilômetros quadrados (23% do território brasileiro), ocupando a região da América do Sul. Essa região é considerada um *Hotspot*, pois apresenta grande diversidade de fauna e flora ameaçada. Até o ano de 2015, cerca de 66% do território do Cerrado já havia sido desmatado, o que implica em perda de biodiversidade de inúmeras espécies já ou não classificadas e identificadas (Oliveira, 2011; Ministério do Meio Ambiente, 2015).

O gênero *Bauhinia* L. é característico do Cerrado e pertence à família Fabaceae. Possui aproximadamente 300 espécies, popularmente conhecidas como pata-de-vaca ou unha-de-boi devido ao formato de suas folhas. São muito utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças como diabetes, infecções, inflamações e para produzir analgesia (Cechinel-Filho, 2009). Alguns estudos têm indicado que a presença de flavonoides na composição química dessas espécies são os responsáveis pela ação terapêutica (Da Silva, 2010).

Algumas espécies como *B. forficata* são muito utilizadas na medicina tradicional e têm demonstrado importante efeito hipoglicemiante, antioxidante, antimicrobiano e anticoagulante (Nogueira & Sabino, 2012).

Um componente isolado do extrato das folhas *Bauhinia megalandra*, Campferol-3-O-raminosídeo foi identificado como potente inibidor da absorção de glicose intestinal em testes *in vitro* realizado por Rodrigues *et. al* (2010), ajudando, portanto, na diminuição da hiperglicemia pós-prandial. Outro composto, isolado do extrato das folhas de *B. megalandra*, a quercetina 3-O- α -(2"-galoil)-ramnosídeo, foi descrito como um potente inibidor da neoglicogênese através da diminuição da atividade da G6Pase (Gonzalez-Mujica *et al.*, 2005).

1.8. Resultados prévios com o extrato de *Bauhinia holophylla* (Steud.)

Estudo em fase de publicação em nosso laboratório mostrou que o extrato bruto com as folhas da *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias, reduziu em 40% a glicemia de jejum de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Fig. 4) além de melhorar a tolerância à glicose nos animais tratados (Fig. 5), diminuir os níveis de colesterol e triglicérides e aumentar o conteúdo do glicogênio hepático. Além disso, vimos que a atividade hipoglicemiante foi através da modulação de proteínas importantes para a via da glicogênese, estimulando, portanto, a síntese de glicogênio.

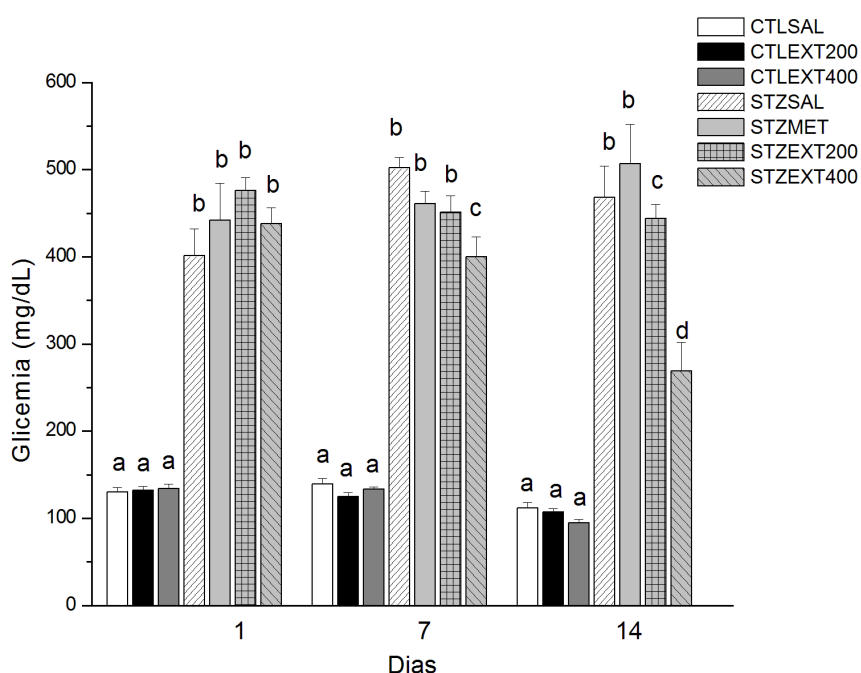


Figura 4. Glicemia de jejum dos animais controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou com extrato de *B. holophylla* na dose de 200 e 400 mg/kg p.c. durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA seguido de Teste tukey, n=10, p<0,05.

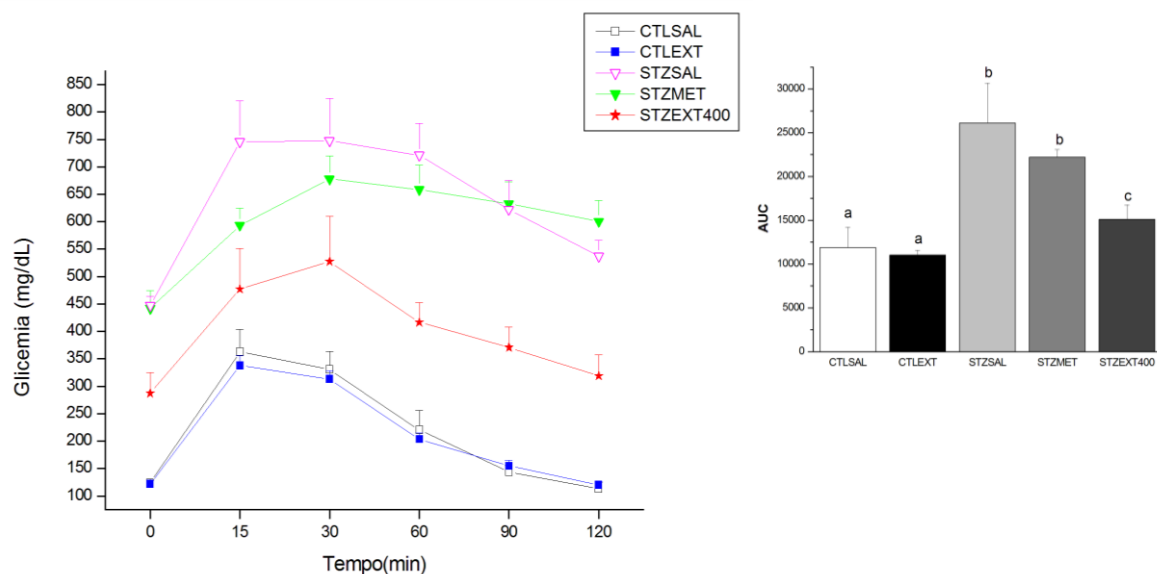


Figura 5. Teste de tolerância à glicose dos animais controles normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou com extrato de *B. holophylla* na dose de 200 e 400 mg/kg p.c. durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença significativa. ANOVA seguido de Teste tukey, n=10, p<0,05.

Diante de tais resultados e dos poucos estudos esclarecendo o mecanismo da ação hipoglicemiante de plantas medicinais na literatura viu-se a necessidade de elucidar e entender como o extrato de *B. holophylla* agiu para melhorar o estado diabetogênico e diminuir a hiperglicemia em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi investigar alterações moleculares realizadas pelo tratamento com o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina nos processos de captação e armazenamento de glicose em fígado e músculo gastrocnêmio através da análise da expressão gênica e proteica.

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 induzidos por estreptozotocina, como G6P, PEPCK, glicoquinase, hexoquinase e GSK3B e suas formas fosforiladas através das técnicas de Real Time-qPCR e Western blotting, respectivamente.
- Investigar os processos de captação de glicose em músculo através da avaliação da expressão de genes e proteínas da via de sinalização de insulina como IR, IRS1, PI3-K, AKT e GLUT-4, assim como suas formas fosforiladas, pelas técnicas de Real Time-qPCR e Western blotting, respectivamente.
- Avaliar o efeito inibitório para enzimas α -amilase e α -glicosidase *in vitro* e *in vivo* em camundongos normoglicêmicos.

Materiais e métodos

3. *Materiais e Métodos*

As etapas de coleta de material vegetal, extração e análises cromatográficas dos extratos foram realizadas em parceria com o Lab. de Química de Produtos Naturais, Departamento de Biologia na UNESP de Bauru, coordenado pela Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal e realizados pelo aluno MSc. Luiz Leonardo Saldanha.

3.1. *Coleta do material vegetal*

Amostras de folhas de *Bauhinia holophylla* foram coletadas no Jardim Botânico Municipal de Bauru às margens da Rodovia Comandante João R. de Barros – SP 225 (22°20'30'' S e 49°00'30'' W). Foi coletado aproximadamente 1 kg de amostras de folhas frescas para os estudos fitoquímicos e ensaios biológicos. Ramos férteis foram utilizados para identificação e herborização. Herborização e armazenamento ficaram a cargo de Luiz Leonardo Saldanha e foram identificados em parceria com a Prof. Dra. Ângela M.S. da Fonseca Vaz, do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, especialista em taxonomia de *Bauhinia*. As exsicatas (*voucher* químico) foram incluídas no Herbário do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob número números de registro RB 507.048. (Autorização de Acesso e Remessa do Patrimônio Genético nº 010468/2014-5).

3.2. *Obtenção dos extratos*

As folhas de *B. holophylla* foram secas em estufa a 45° C por 48 h. Em seguida, foram pulverizadas em moinho de facas (Marcogni, SP, Brasil) a fim de facilitar a extração. A extração foi realizada por percolação do pó com EtOH 70% (Prista, 1995). O material moído (686 g) foi previamente intumescido com 2 litros de etanol 70% (v/v) durante 2 h em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70%), sendo o empacotamento realizado da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas

ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1 (referente ao volume do percolador e do material vegetal) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou entre 1-2,0 mL.min-1.kg de material vegetal. Com este processo obtivemos o extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla* com rendimento de 29,5% a partir de matéria seca.

3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo PU-2089S Plus (Jasco®, Tóquio, Japão), acoplado a detector de arranjo de fotodiodos (HPLC-PAD) com faixa de varredura de 200 - 900 nm, modelo MD-2015 Plus (Jasco®). As análises foram realizadas em coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm) (Phenomenex®) e vazão de 1 mL/min.

3.4. Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss com 60±10 dias de idade, n=10, provenientes do Biotério Central da UNESP. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da UNESP – Bauru, sob temperatura controlada (23 ± 2°C) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida e água. Os experimentos foram aprovados pela comissão de ética em uso de animais sob o protocolo nº 520-CEUA.

3.5. Indução do Diabetes

Os camundongos selecionados para os grupos diabéticos tiveram o diabetes experimental induzido por meio de uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina (150 mg/kg) após jejum de 10 horas. A STZ foi diluída em tampão Citrato de Sódio (pH 4,5) em

gelo em abrigo da luz. Após três horas da indução os animais receberam solução de glicose 10% para prevenção de morte por hipoglicemia e tiveram acesso à ração. Sete dias após a indução, os animais que apresentaram glicemia ≥ 250 mg/dL foram incluídos no experimento.

3.6. *Divisão dos grupos*

Os animais foram selecionados aleatoriamente e divididos em grupos:

- **CTLSAL:** Camundongos normoglicêmicos tratados com salina 0,9% via gavagem durante 14 dias (n=10).
- **CTLEXT:** Camundongos normoglicêmicos tratados com o extrato bruto de *B. holophylla* (400mg/kg p.c., diluído em salina) via gavagem durante 14 dias (n=10).
- **STZSAL:** Camundongos diabéticos tratados com salina 0,9% via gavagem durante 14 dias (n=10).
- **STZEXT:** Camundongos diabéticos tratados com o extrato de *B. holophylla* (400mg/kg p.c., diluído em salina) via gavagem durante 14 dias (n=10).

3.7. *Extração proteica e Western Blotting*

Alíquotas de fígado e músculo foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) em coquetel anti-protease a 4° C. Após 20 minutos de centrifugação em 12.000 rpm a 4° C, o conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi determinado por espectrofotometria através do método de Bradford, utilizando kit comercial (Bio-Rad Kit, Hercules, CA) com albumina como padrão. Alíquotas contendo 80 µg de proteína total foram aquecidas 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. O bloqueio e a detecção das proteínas por anticorpos primário e secundário foram realizadas utilizando sistema de detecção à vácuo SNAPid da Millipore®. A membrana foi armazenada em solução bloqueadora contendo BSA 5% em solução basal (10 mM Trisma base, 150mMNaCl, 0,05% Tween 20) por 1 minuto. Em seguida, foi lavada com solução basal a temperatura ambiente (TA). As proteínas foram detectadas na membrana após incubação por 10 minutos com anticorpo primário específico para cada uma em solução basal contendo albumina 3%, seguida de lavagem e incubação por 10 minutos com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP em solução basal contendo BSA 1% em Temperatura Ambiente. As membranas foram lavadas e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) e expostas ao filme autoradiográfico (Kodak T-Mat G/RA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria (Rafacho *et al.*, 2007).

3.8. Extração de RNA

Cerca de 100mg de amostras de fígado e músculo foram coletadas de cada grupo, homogeneizados (Polytron PT 1200C) e estocados a -80° C em 1 mL de Trizol (Invitrogen). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 200 µL de clorofórmio às amostras e as mesmas foram centrifugadas a 13.000g 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 colocadas em Freezer -20° C durante 10 minutos para ajudar na formação do pellet e então novamente centrifugadas a 13.000g durante 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido em 500 µL de álcool 75% preparado com água DEPC. As amostras foram centrifugadas a 8.000g durante 5 minutos a 4° C e novamente o sobrenadante foi descartado. Foi adicionado 500 µL de álcool absoluto e centrifugado novamente a 8.000g 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 espectrofotômetros Nanodrop (ThermoScientific) e Qubit (Invitrogen). As razões 260/280 e 260/230 obtidas no Nanodrop foram mensuradas para verificar a pureza das amostras.

3.9. Síntese de cDNA

Após a quantificação de RNA em cada amostra, a reação de transcrição 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. Foi 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 RT -qPCR.

3.10. Análise da expressão gênica utilizando PCR quantitativo em tempo real após transcrição reversa (RT-qPCR)

Para a análise da expressão gênica foi utilizada a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa pós transcrição reversa (RT-qPCR). 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 5µL. Para tanto, foram pipetados 1 µL de cDNA (1000ng), 0,25 µL de cada sonda específica para cada gene (G6Paseα – Mm00839363_m1;

Glicoquinase – Mm00439129_m1; GSK3 β – Mm00444911_m1; IR – Mm012111875_m1; IRS1 – Mm01278327_m1; PI3Kp85 α – Mm00803160_m1; AKT ½ - Mm01331626_m1; GLUT4 – Mm01245502_m1; PEPCCK1 – Mm01247058_m1; Glicogênio fosforilase – Mm01289790_m1; Glicogênio Sintase 2 – Mm01267381_m1; Gapdh - Mm03302249_g1) (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems), 2,5 μ L do TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) e 1,25 μ L com água livre de RNAses. A reação foi realizada em 40 ciclos no StepOne 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. O cálculo da quantificação relativa foi realizado através da seguinte equação: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A expressão dos genes alvo foi determinada em função da expressão do gene de referência GADPH para fígado e músculo.

3.11. *Avaliação da atividade inibitória do extrato de B. holophylla em α -glicosídeos e α -amilases in vitro.*

Os ensaios descritos à seguir foram realizados em parceria com o Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro sob supervisão do pesquisador Mário Senger.

3.11.1. *Ensaio Enzimático para α -Glicosídeos*

➤ *Reagentes*

α -Glicosidase de *Saccharomyces cerevisiae* (MAL12; #CAS: 9001-42-7), *p*-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (α -PNPG; #CAS: 2492-87-7), α -Amilase tipo I-A de pâncreas suíno (α -APS) - #CAS: 9000-90-2 - suspensão em 2,9 M NaCl contendo 3 mM CaCl₂, 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriosídeo (α -CNPG3) - #CAS: 118291-90); acarbose -

#CAS: 56180-94-0), cloreto de cálcio, cloreto de sódio e demais reagentes de grau analítico, quando não especificados, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (USA).

➤ *Ensaios de cinética enzimáticas das α -glicosidases*

A atividade enzimática das glicosidases foi avaliada em um volume final de 50 μ L 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 α -Amilase pancreática suína contendo tampão HEPES (50 mM, pH 7.0), CaCl_2 (5mM), NaCl (100mM) foi pré-incubada à 37° C por 5 minutos, a reação foi iniciada pela adição de CNPG3 (1mM). 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.

3.11.2. *Determinação da CI_{50}*

As reações foram realizadas conforme descrito acima. A concentração de inibidor que promove 50% de inibição da atividade enzimática (CI_{50}) foi determinada pela titulação de pelo menos oito concentrações do extrato bruto (1250; 312,5; 78,125; 39,06; 19,53; 9,77; 4,88; 2,44; 1,22; 0,61; 0,31; 0,15; 0,08 $\mu\text{g/mL}$) de *B. holophylla*, juntamente com cada enzima durante 5 minutos a 37 °C. Os valores de CI_{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: $\text{Ativ. Res.} = \text{min} + (\text{max}-\text{min}) / (1 + ([\text{I}]/\text{IC}_{50})^{(-\text{Coef.Hill})})$. A acarbose foi utilizada como controle positivo.

3.11.3. *Ensaíos de reversibilidade*

As glicosidases foram incubadas a uma concentração de 100-vezes acima do valor requerido para o ensaio de atividade com uma concentração de inibidor equivalente a 10-vezes o IC₅₀ (Senger *et al.*, 2012). Após 30 min de incubação, a reação foi iniciada pela diluição 100-vezes no tampão de reação contendo o substrato. A curva de progresso foi comparada a uma amostra semelhante da enzima incubada e diluída na ausência do inibidor.

3.12. *Teste de absorção de amido e maltose em camundongos normoglicêmicos*

Camundongos normoglicêmicos foram mantidos em jejum de 10-12 horas e então foram divididos em três grupos: CTLSAL (tratados com salina via oral), AC (tratados com acarbose 10 mg/kg via gavagem oral) e BH (tratados com o extrato de *B. holophylla* 400 mg/kg via oral). O sangue dos camundongos foi coletado para dosagem da glicemia (tempo 0') e receberam seus respectivos tratamentos. Após 10 minutos receberam via oral a solução de amido ou maltose (2g/kg). Após a gavagem, a glicemia foi mensurada nos tempos 30, 60 e 120 minutos utilizando glicosímetro (Onetouch, Johnson & Johnson). A mudança da glicemia após a ingestão de amido e maltose foi analisada e representada como desvio da área sob a curva de cada grupo.

3.13. *Análise dos resultados*

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizada ANOVA seguido de teste Tukey. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Resultados

4. Resultados

PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO DE *B. holophylla*

Segundo análises do Ms. Luiz Leonardo Saldanha, o perfil cromatográfico do extrato EtOH 70% das folhas de *B. holophylla* (EEtOH70%) foi obtido por HPLC-PAD (Fig. 6). A partir da análise dos espectros de UV-vis obtidos dos picos presentes no cromatograma, pode-se observar duas classes de compostos naturais majoritárias. Na primeira parte do cromatograma se observa picos com tempo de retenção entre 0 e 15 min com espectros de UV com $\lambda_{\text{máx}} = 259$ nm, típico de cianoglicosídeos (WU et al., 1979; HAN et al., 2001). Já os picos com tempo de retenção entre 15 e 35 min apresentam espectros de UV com $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm e 340-370 nm, típico de flavonoides os quais são reconhecidos por apresentarem a Banda II, com máximos na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel-A e da Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída aos anéis B e C (MERKEN e BEECHER, 2000).

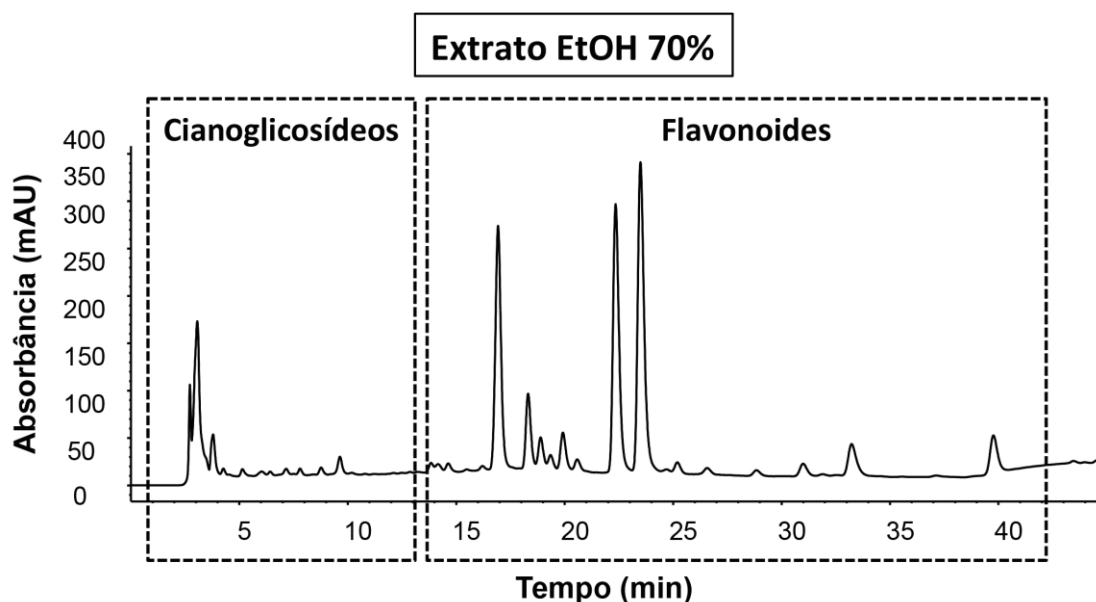


Figura 6 - Cromatograma analítico do extrato EtOH 70% das folhas de *Bauhinia holophylla* obtido por HPLC-DAD extraído em 254 nm. Os retângulos pontilhados indicam a região de cianoglicosídeos (Tr = 3-10 min) e flavonoides (Tr= 12-41 min). Condições do método: solventes MeOH (A) e H₂O (B) com 0.1% ácido fórmico. Coluna: Luna C18 (250 x 4.6 mm d.i., 5 μ m). Gradiente linear: tempo 0' - 25% de A; tempo 15' - 33% de A; tempo 40' - 60%. Vazão de 1 mL.min⁻¹. Temperatura da coluna: 25°C. Vol. de injeção: 10 μ L.

Ensaíos Experimentais *Fígado*

ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM O EXTRATO BRUTO DE *B. holophylla* APRESENTARAM AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE GLICOGÊNESE

Esta parte do estudo foi composta da análise da expressão de mRNA dos genes das proteínas da via do metabolismo de glicose em fígado.

Nossos resultados mostram que o grupo STZEXT apresentaram diminuição significativa da expressão dos genes IRS- 1, PI3K e AKT (Fig. 7A, B e C) quando comparado ao grupo CTLSAL e não apresentando diferença significativa em relação ao grupo STZSAL ($p>0,05$). Em contrapartida, ao analisarmos a expressão gênica da GSK3 β (7D) e GS (7E), o grupo diabético tratado com o extrato apresentou aumento quando comparado ao grupo STZSAL ($p<0,05$)

.

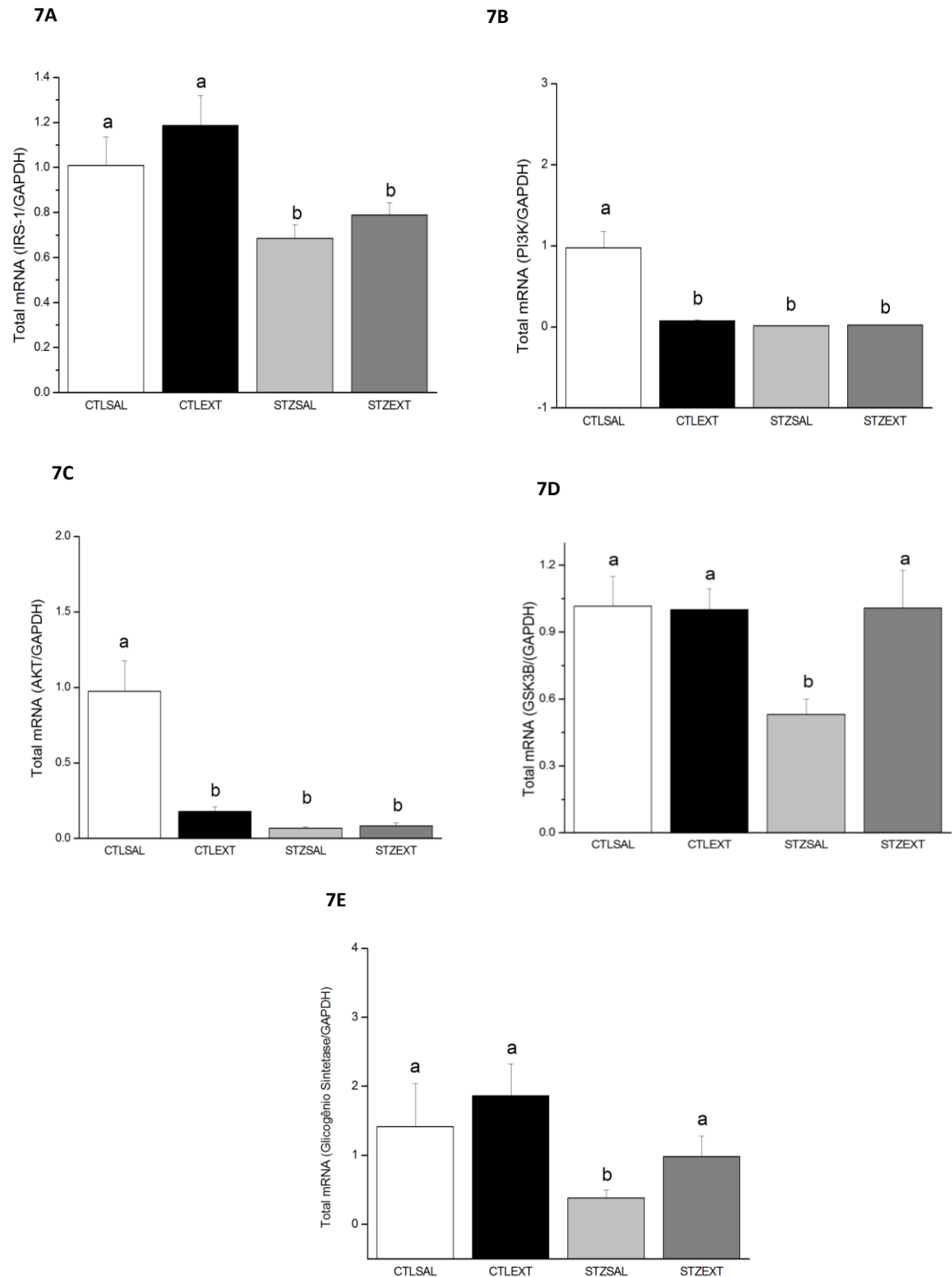


Figura 7. Expressão de mRNA total dos genes referentes à via de glicogênese IRS-1 (A), PI3K (B), AKT (C), GSK3 β (D) e GS (E). Grupo STZEXT apresentou diferença significativa para os genes GSK3 β e GS quando comparado ao grupo STZSAL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando gene de referência.

O TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *B. holophylla* ESTIMULOU O AUMENTO DA EXPRESSÃO DE PROTEINAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE GLICOGÊNESE

Resultados anteriores em nosso laboratório mostraram que o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* foi capaz de aumentar a síntese de glicogênio através do aumento da expressão proteica da glicogêniosintetase (GS) em fígado no grupo STZEXT. Nesse estudo, avaliamos a expressão da forma fosforilada da proteína GSK3 β (Fig. 8), precursora da GS, e enzima essencial para o metabolismo de glicose. Após o tratamento, o grupo STZSAL apresentou diminuição significativa da fosforilação quando comparado aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZEXT ($p < 0,01$). O aumento na fosforilação dessa proteína leva à diminuição da fosforilação da enzima GS, aumentando sua atividade e aumentando a síntese de glicogênio.

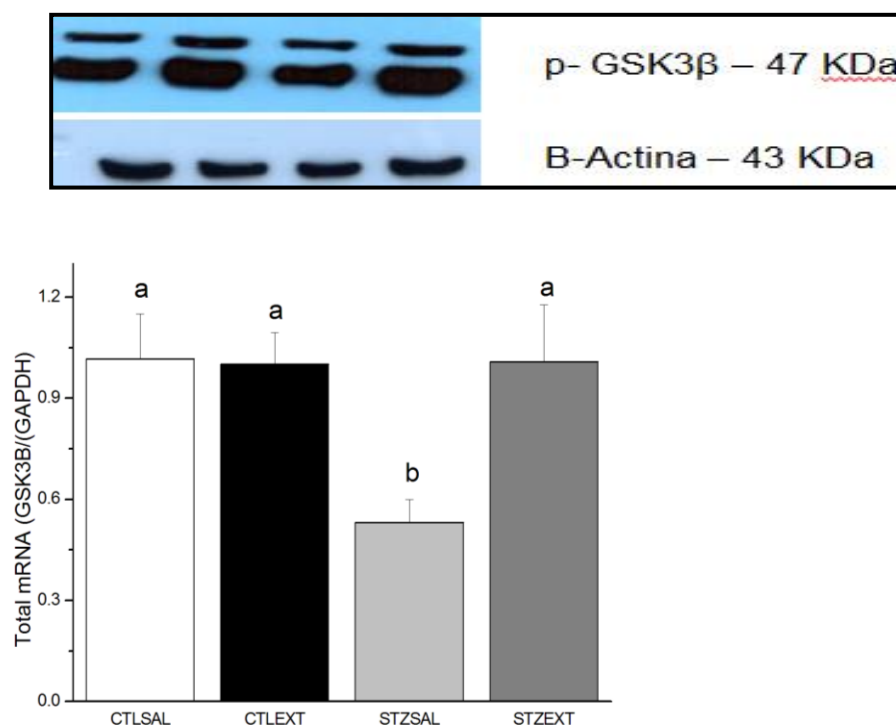


Figura 8. Expressão da proteína p-GSK3 β em camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina e extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p < 0.01$. B- actina representando o controle interno.

O TRATAMENTO COM O EXTRATO DE *B. holophylla* INIBIU GENES ENVOLVIDOS NOS PROCESSOS DE GLICOGENÓLISE E GLICONEOGÊNESE

A enzima glicoquinase está envolvida no processo de glicólise, importante processo mediado pela insulina para quebra de glicose para formação de ATP (energia). Os grupos STZSAL e STZEXT apresentaram redução da expressão gênica da GcK (9A) quando comparados aos grupos CTLSAL e CTLEXT ($p < 0,05$).

O grupo STZEXT apresentou diminuição do gene Glicogênio fosforilase (GF) (Fig. 9B), importante enzima para a glicogenólise, quando comparado aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZSAL ($p < 0,01$). O grupo STZSAL apresentou aumento dos genes G6Pase (Fig. 10A), PEPCK (Fig. 10B) em relação aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZEXT ($p < 0,05$), já o grupo STZEXT apesar de apresentar redução da expressão de tais genes quando comparado ao grupo STZSAL, ainda assim, apresentou maior expressão desses genes em relação aos grupos CTLSAL e CTLEXT ($p < 0,05$).

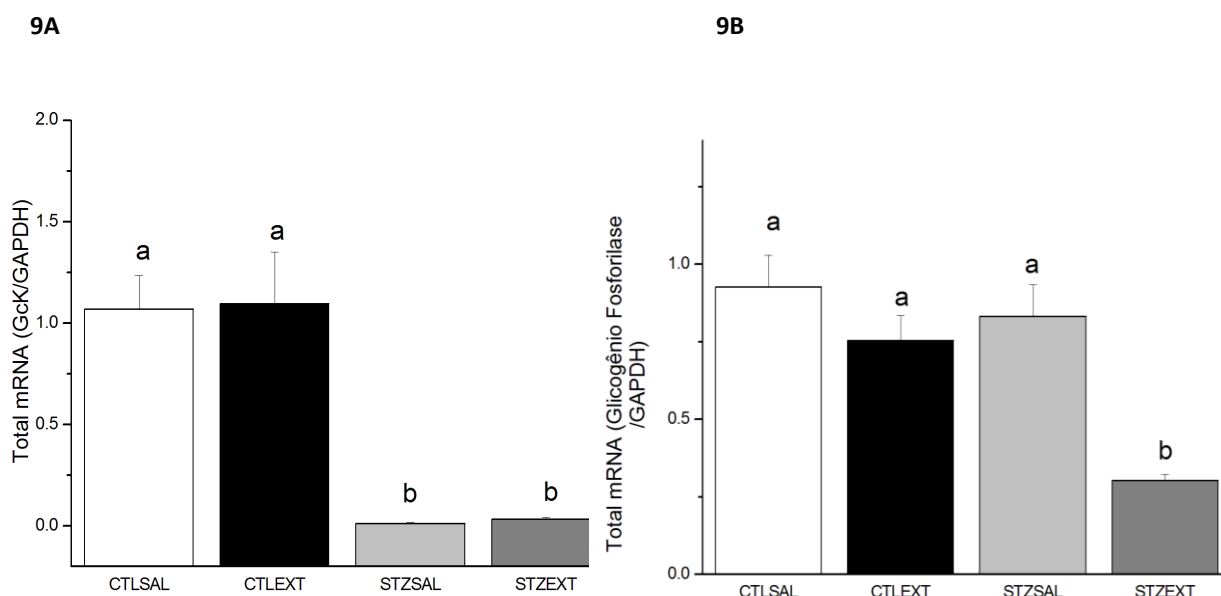


Figura 9. Expressão de mRNA total dos genes referentes a via de glicogenólise. GcK (A) e GF (B). Grupo STZEXT apresentou diminuição significativa para o gene GF quando comparado ao grupo STZSAL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p < 0.05$. GAPDH representando gene de referência.

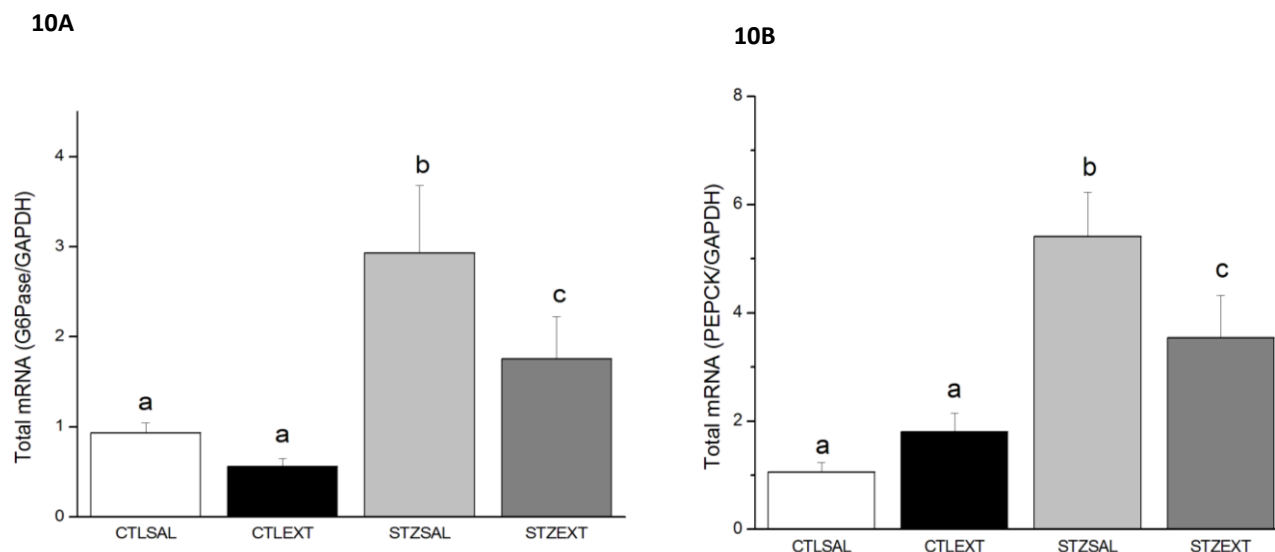


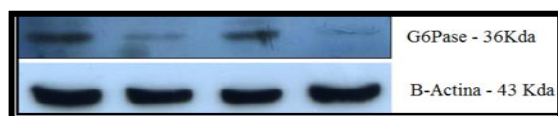
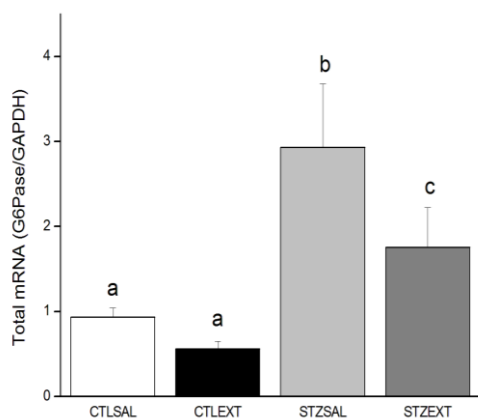
Figura 10. Expressão de mRNA total dos genes referentes à via de gliconeogênese. G6Pase (A) e PEPCK (B). O Grupo STZEXT apresentou redução significativa para os genes G6Pase e PEPCK quando comparado ao grupo STZSAL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando gene de referência.

ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM O EXTRATO BRUTO DE *B.*

holophylla APRESENTARAM DIMINUIÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA DAS ENZIMAS PEPCK E G6Pase

Foram analisadas, ainda, proteínas importantes da via da gliconeogênese como G6Pase (Fig. 11A) e PEPCK (Fig. 11B). A análise da expressão proteica dessas enzimas mostrou aumento significativo nos animais diabéticos tratados com salina, enquanto que o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias em camundongos diabéticos resultou em uma diminuição da expressão destas proteínas no grupo STZEXT em relação ao grupo STZSAL ($p<0,001$).

11A



11B

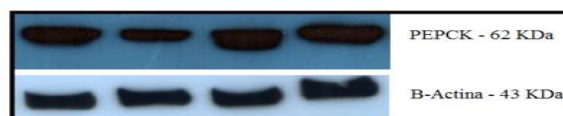
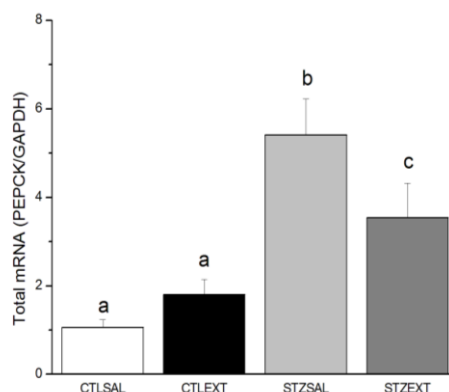


Figura 11. Análise da expressão protéica da enzima G6Pase (Fig. 8A) e PEPCK (Fig. 8B) em fígado de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina e extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. B- actina representando o controle interno.

Para um estudo completo acerca dos mecanismos de ação do extrato, analisamos a expressão da proteína AMPK (Fig. 12) em fígado, importante para o metabolismo de lipídeos e também para o processo de neoglicogênese. Após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* houve aumento significativo da expressão da AMPK no grupo STZEXT em relação ao grupo diabético STZSAL ($p<0,01$).

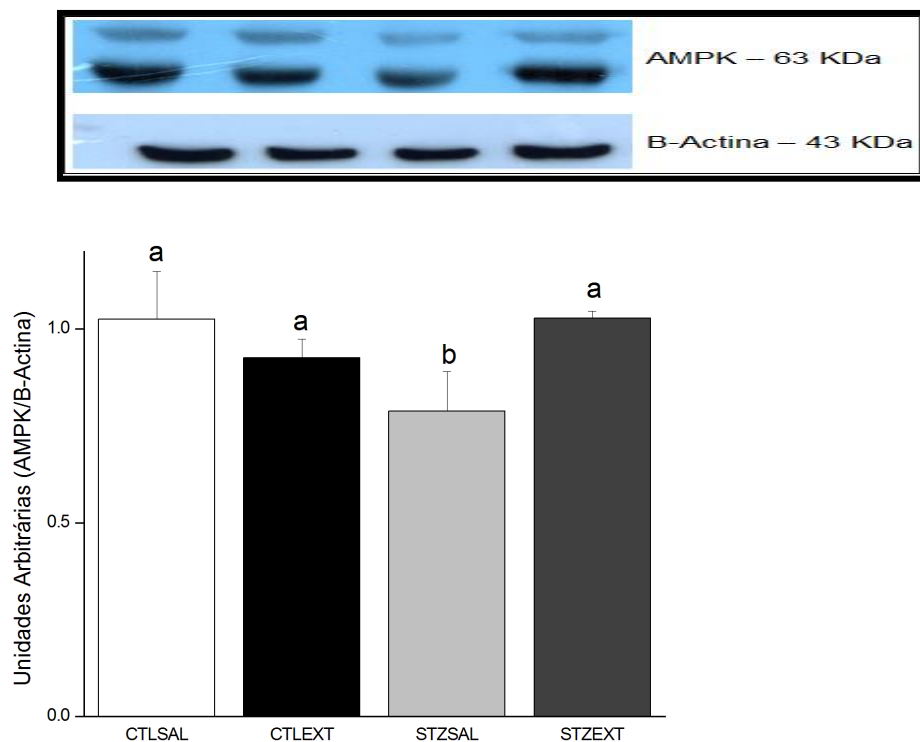


Figura 12. Análise da expressão da proteína AMPK em camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina e extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. B- actina representando o controle interno.

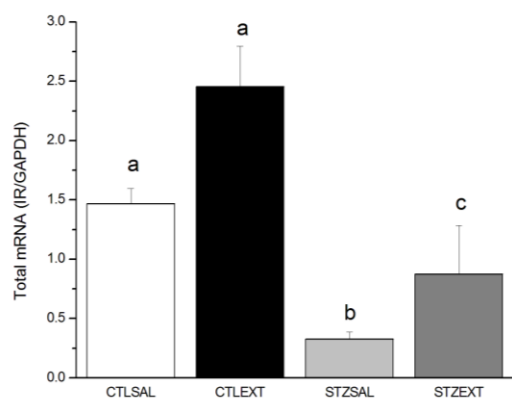
ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM O EXTRATO BRUTO DE *B. holophylla* APRESENTARAM AUMENTO DA EXPRESSÃO DE mRNA DE GENES ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CAPTAÇÃO DE GLICOSE EM MÚSCULO

Nossos resultados mostraram que o grupo STZSAL mostrou diminuição da expressão de mRNA do receptor de insulina (IR) (Fig. 13A) em relação aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZEXT ($p<0,05$). Os grupos CTLSAL, CTLEXT, STZSAL e STZEXT não apresentaram diferença estatística significativa na expressão gênica da PI3K. ($p>0,05$) (Fig. 13B).

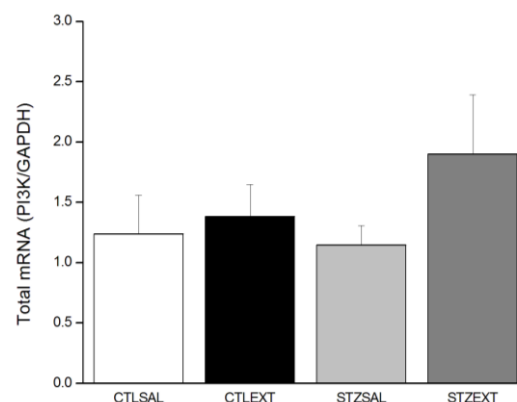
O grupo STZSAL apresentou redução da expressão gênica da AKT (Fig. 13C) e GLUT4 (Fig. 13D) quando comparado aos grupos CTLSAL, CTLEXT e STZEXT ($p<0,01$).

O grupo STZSAL apresentou diminuição da expressão gênica da GS quando comparado ao grupo CTLSAL ($p<0,01$). Em contrapartida, os grupos CTLEXT e STZEXT mostrou aumento da expressão do gene GS (Fig. 14) após o tratamento com o extrato de *B. holophylla* em relação ao grupo STZSAL ($p<0,01$).

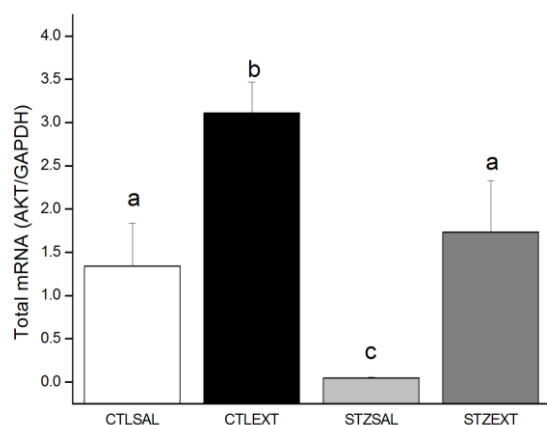
13A



13B



13C



13D

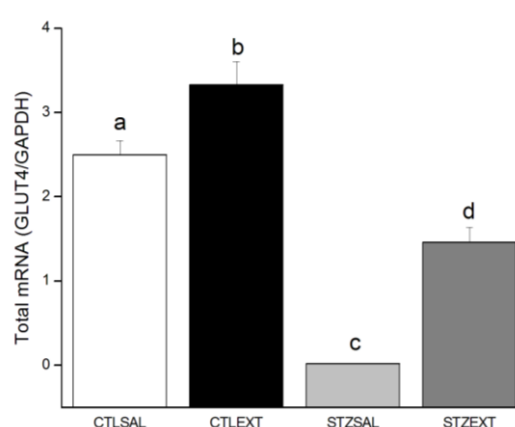


Figura 13. Expressão de mRNA total dos genes referentes a via da captação de glicose. IR (A), PI3K (B), AKT (C) e GLUT4 (D). Grupo STZEXT apresentou aumento significativo para os genes AKT e GLUT4 quando comparado ao grupo STZSAL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando gene de referência.

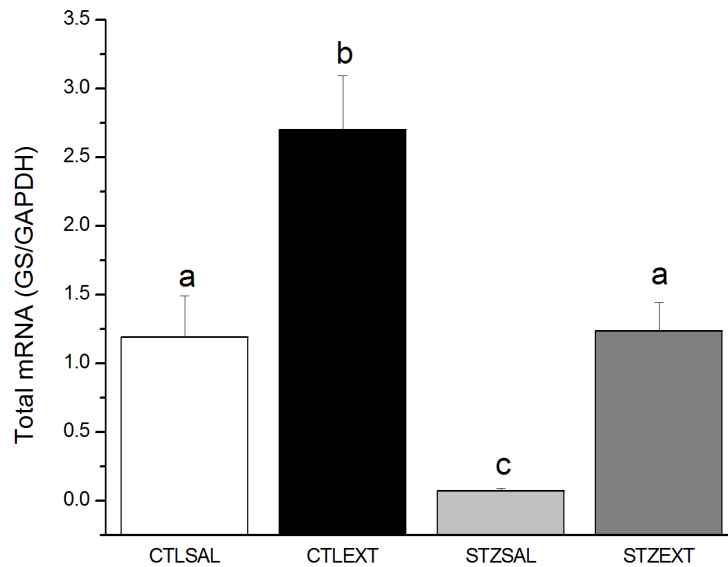


Figura 14. Expressão de mRNA total do gene da enzima GS. Grupo STZEXT apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo STZSAL. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando gene de referência.

ANIMAIS DIABÉTICOS TRATADOS COM O EXTRATO BRUTO DE *B. holophylla* APRESENTARAM AUMENTO DA EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA PI3K/AKT

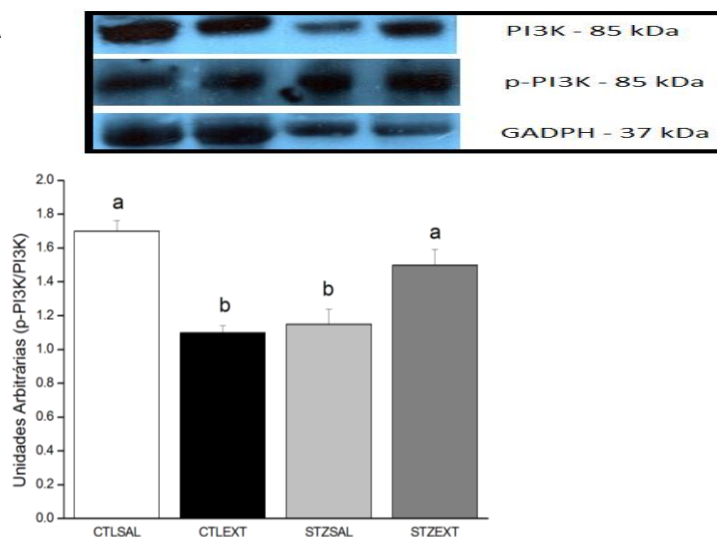
Foram analisadas as expressões das proteínas PI3K (Fig. 15A), AKT (Fig. 15B) e GLUT4 (Fig. 15C) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com o extrato bruto de *B. holophylla* ou salina. O grupo STZSAL apresentou redução da expressão da PI3K, AKT e GLUT4 e suas formas fosforiladas quando comparado ao grupo CTLSAL ($p<0,05$), enquanto que o grupo STZEXT apresentou aumento da expressão de tais proteínas após o tratamento com o extrato, não mostrando diferença com o grupo CTLSAL ($p>0,05$), o que indica um possível favorecimento do extrato na via de captação de glicose em músculo dos animais tratados.

A captação de glicose em músculo também pode ser estimulada por ativação da AMPK, uma via independente de insulina, por isso, analisamos também a expressão total da

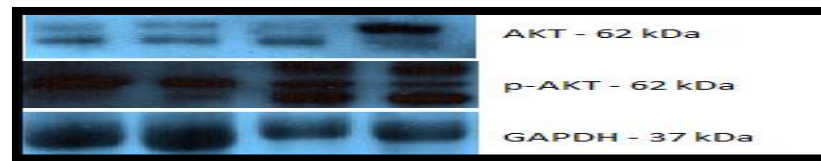
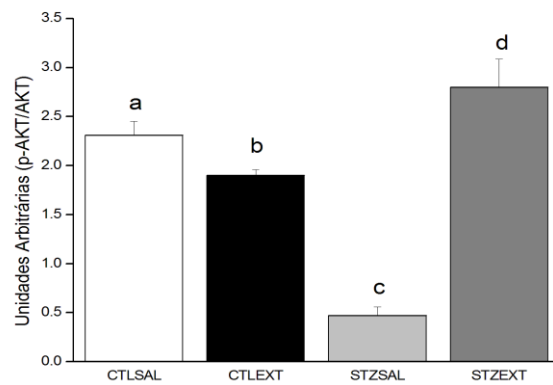
AMPK (Fig. 16) em músculo de animais normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *B. holophylla*. Animais diabéticos tratados com salina apresentaram diminuição da expressão da AMPK em músculo, enquanto que o grupo STZEXT mostrou um aumento significativo desta proteína quando comparado ao grupo STZSAL ($p<0,05$).

A homeostase da glicose se dá, ainda, pela inibição dos chamados reguladores negativos dos receptores de insulina (IR). Diversas proteínas tirosinas-fosfatases agem diminuindo a sensibilidade à insulina no seu receptor, incluindo a PTP1B, por isso inibidores dessas proteínas são de suma importância e são alvos terapêutico para o tratamento de DM. Para avaliar a possível atividade inibitória do extrato bruto sobre a PTP1B (Fig. 17), analisamos a expressão dessa proteína em camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina ou com o extrato bruto de *B. holophylla* e nossos resultados mostram que houve uma redução significativa no grupo STZEXT quando comparado ao grupo STZSAL ($p<0,001$).

15A



15B



15C

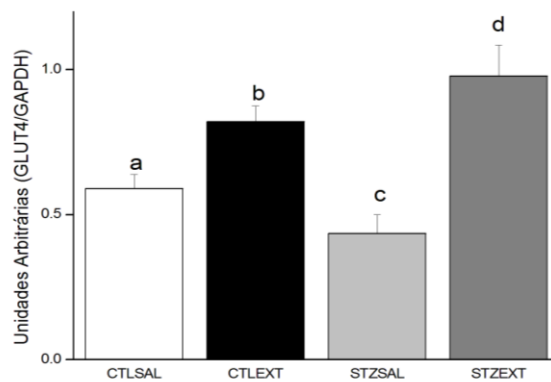


Figura 15. Expressão proteica da PI3K (A), AKT (B) e GLUT4 (C) em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com o extrato bruto de *B holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Nota-se aumento significativo na expressão das proteínas analisadas. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando o controle interno.

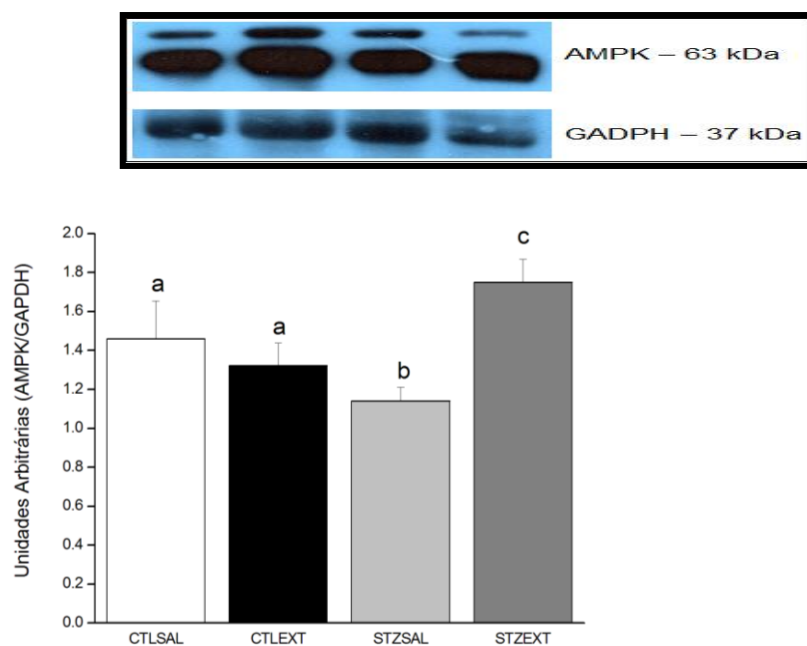


Figura 16. Expressão da AMPK em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com o extrato bruto de *B holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$.

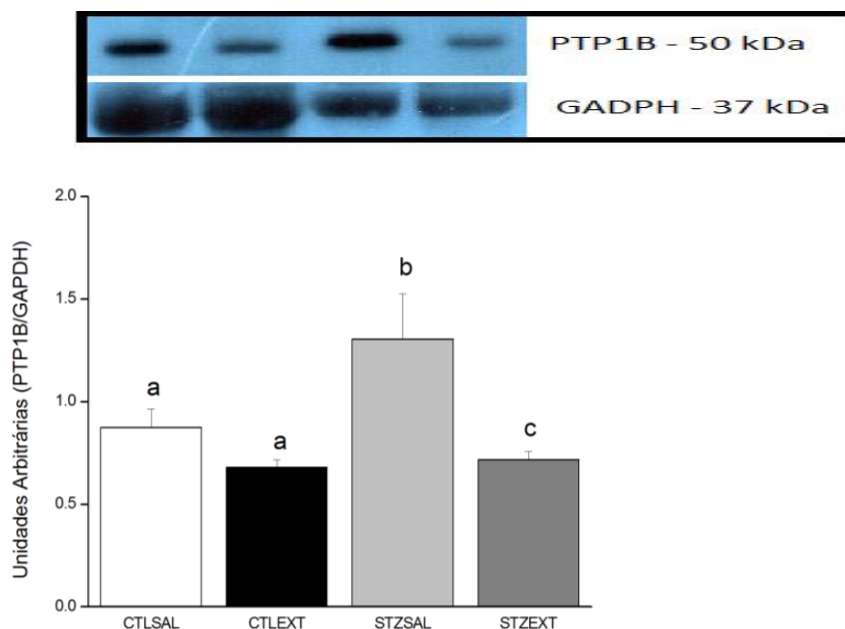


Figura 17. Expressão da PTP1B em músculo de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratados com salina e com extrato bruto de *B holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$. GAPDH representando controle interno.

EXTRATO BRUTO DE *B. holophylla* FOI CAPAZ DE INIBIR ENZIMAS α -GLICOSIDASES EM TESTES *IN VITRO*

No intuito de investigar os possíveis mecanismos de ação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *B. holophylla* avaliamos a possível atividade inibitória do extrato para enzimas α -amilase e α -glicosidase. Foi determinado o CI_{50} (concentração de inibidor que promove 50% de inibição da atividade enzimática).

Nossos resultados mostraram que o extrato bruto de *B. holophylla* apresentou valor CI_{50} de 28,04 $\mu\text{g/ml}$ para α -amilase (Fig. 18) e 43,01 $\mu\text{g/ml}$ para α -glicosidases, no caso a maltase (Fig. 19), tendo uma inibição lentamente reversível (slowly reversible).

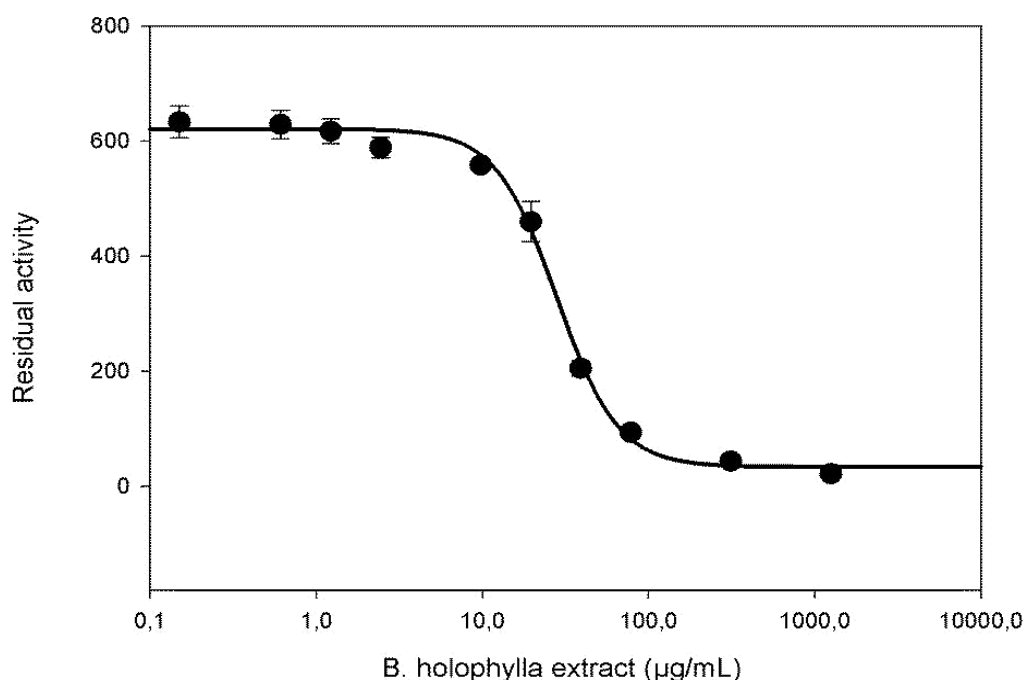


Figura 18. Curva de inibição concentração – dependente do extrato bruto de *B. holophylla* para α -amilase.

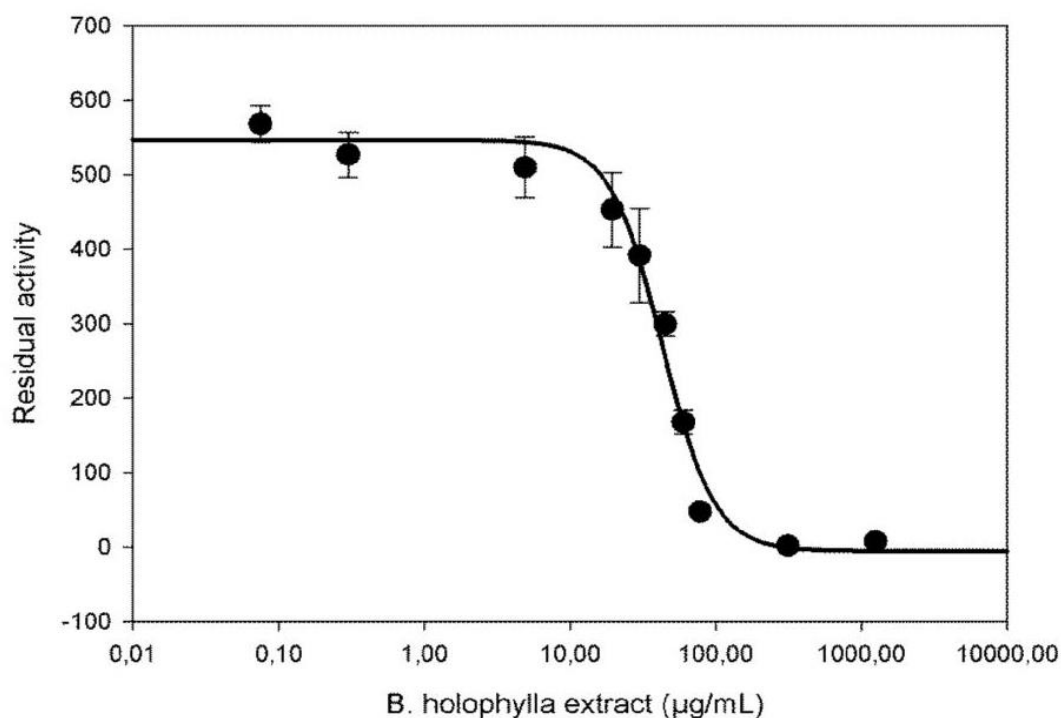


Figura 19. Curva de inibição concentração – dependente do extrato bruto de *B. holophylla* para α -glicosidase.

**EXTRATO DE *B. holophylla* DIMINUI A ABSORÇÃO DE GLICOSE PÓS
ALIMENTAR ATRAVÉS DA INIBIÇÃO DAS ENZIMAS α - AMILASE E α -
GLICOSIDASE EM CAMUNDONGOS NORMOGLICÊMICOS.**

A diminuição da glicemia pós-prandial é importante para manutenção da homeostase da glicose em pacientes diabéticos, por isso inibidores de enzimas responsáveis pela digestão de carboidratos são muito importantes para esse controle. Nossos testes *in vitro* mostraram que o extrato de *B. holophylla* apresentou potente inibição para amilase e maltase, sendo mais eficiente que a acarbose para maltase.

O teste *in vivo* de inibição para α -amilase nos mostrou que trinta minutos após a administração da solução de amido na dose de 2g/kg, o grupo controle tratado com salina apresentou aumento da glicemia quando comparado aos demais grupos e sessenta minutos após, apresentou redução dos índices de glicose, retornando aos níveis basais duas horas após a administração da solução.

Tanto o grupo tratado com Acarbose, principal fármaco utilizado para controlar a glicemia pós-alimentar, quanto o grupo BH não apresentaram pico de glicose após a administração da solução de amido, corroborando a ação inibitória para as enzimas responsáveis pela quebra de amido para formação de maltose (Fig. 20).

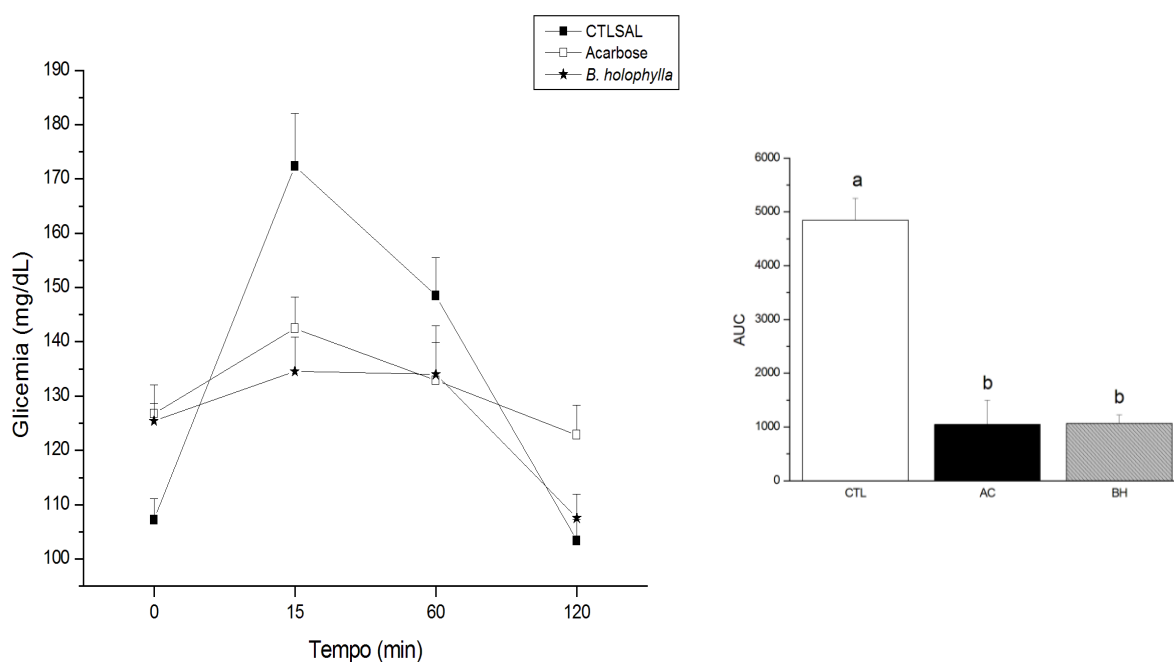


Figura 21. Animais tratados com acarbose (10 mg/kg) e *B. holophylla* (400 mg/kg) apresentaram redução da absorção de glicose. Análise da absorção de glicose através da área sobre a curva. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$.

Conforme esperado, o teste de inibição para maltose mostrou que trinta minutos após a administração da solução de maltose, o grupo CTLSAL apresentou pico de glicemia retornando aos níveis basais após duas horas do início do experimento, mostrando total absorção da glicose. Já os grupos AC e BH não apresentaram aumento da glicemia após a ingestão da solução de maltose, sendo que o grupo tratado com o extrato de *B. holophylla* foi mais efetivo que o tratado com a acarbose, como pode ser visto na figura da análise da área sobre a curva (Fig. 21), mostrando potente atividade inibitória para α -glicosidases e, portanto, menor aumento da glicemia.

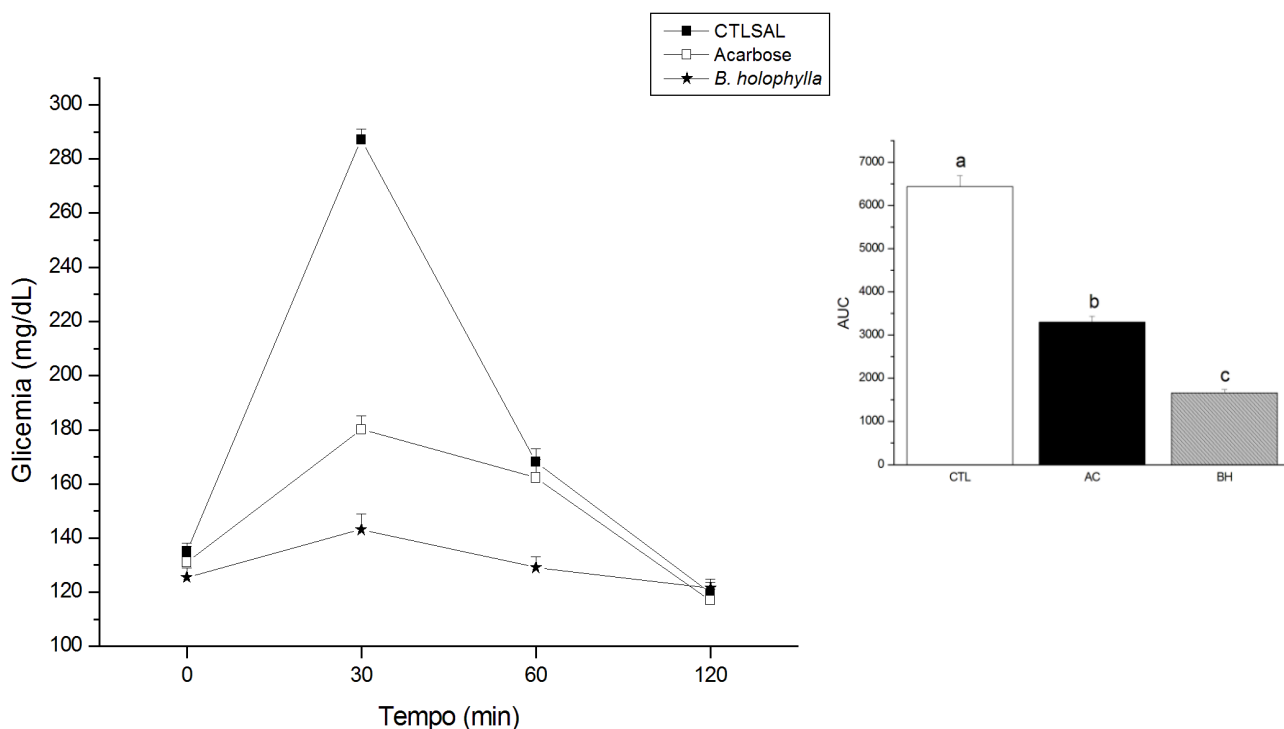


Figura 20. Animais tratados com acarbose (10 mg/kg) e *B. holophylla* (400 mg/kg) apresentaram redução da absorção de glicose. Análise da absorção de glicose através da área sobre a curva. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. Valores expressos como média $\pm$ erro padrão da média. ANOVA seguido de teste Tukey, $n=8$, $p<0.05$.

Discussão

5. Discussão

Em resultados anteriores vimos que o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* na dose de 400 mg/kg durante 14 dias foi capaz de diminuir em 40% os níveis de glicose em jejum de camundongos diabéticos ao final do tratamento, estimulando a expressão de proteínas envolvidas no processo de glicogênese sem alterar os níveis de insulina basal possuindo, portanto, efeito extra pancreático (Dados em fase de publicação).

Sabe-se que o fígado, através da ação da insulina, tem papel fundamental na manutenção da homeostase da glicose através da sua captação e conversão em glicogênio e triglicerídeos no estado pós alimentar e da produção de glicose no estado pós-absortivo pela glicogenólise e gliconeogênese. A enzima responsável pela síntese de glicogênio é a glicogênio sintetase (GS) que catalisa a adição de α -1,4-ligada a unidade de glicose do uridina difosfato glicose (UDP) para a formação de uma nova cadeia de glicogênio. A ativação da AKT fosforila e inibe a proteína GSK3 β , diminuindo a taxa de fosforilação da GS o que aumenta sua atividade, (Carvalheira, Zechin & Saad, 2002; Wilamowitz-Moellendorff *et al.*, 2014). Em pacientes diabéticos, devido à diminuição da secreção ou defeitos na ação da insulina, processos como a glicogênese estão prejudicados e portanto a glicose em excesso não é estocada na forma de glicogênio (Bischof *et al.*, 2002).

Ao analisarmos a expressão gênica e proteica da via da síntese de glicogênio (glicogênese), vimos que o tratamento com o extrato de *B. holophylla* aumentou a expressão gênica da enzima GSK3 β e da glicogênio sintetase (GS), não apresentando diferença significativa na expressão dos genes IRS-1, PI3K e AKT. A expressão proteica, no entanto, mostrou aumento dessas proteínas nos animais diabéticos tratados com o extrato, o que provavelmente colaborou para o aumento do conteúdo de glicogênio hepático visto anteriormente, resultando na melhora da glicemia. Estudos com plantas hipoglicemiantes têm mostrado a habilidade das mesmas em estimular a atividade da enzima GS tanto *in vitro*

quanto *in vivo*, resultando, portanto no aumento do conteúdo do glicogênio hepático prejudicado em portadores de diabetes (Singh *et al.*, 2001). Diante dos resultados expostos anteriormente, podemos inferir que o extrato de *B. holophylla* estimulou a síntese de glicogênio hepático por meio do aumento da expressão gênica e proteica de enzimas-chaves envolvidas na via e conseqüentemente, diminuindo a glicemia nos animais diabéticos tratados.

Além de ser estocada na forma de glicogênio ou gordura, a glicose pode ainda sofrer outro processo chamado glicólise ou oxidação da glicose que consiste na sua quebra para liberação de fosfato e ATP para geração de energia. Após entrar na célula através do receptor do transportador de glicose, a glicose é então oxidada por quatro tipos diferentes de hexoquinase, dependendo do tipo celular, no caso de células β e hepatócitos, a hexoquinase IV ou glicoquinase. Além disso, em células β , a glicoquinase é considerada um sensor de glicose dentro dessas células, pois após a entrada da glicose através do transportador de glicose do tipo 2, é então oxidada pela glicoquinase e a liberação de fosfato e ATP faz com que ocorra uma série de eventos que culminam na secreção de insulina para a corrente sanguínea, como explicado anteriormente. Portanto, ativadores dessa enzima, possuem dois mecanismos de ação: estimulam a liberação de inulina no pâncreas e estimulam a glicólise em fígado (Kietzmann & Ganjam, 2005).

Para verificar a ação do extrato na via da glicólise, foi feita a análise da expressão gênica da glicoquinase (GCK). Nossos resultados mostram que o tratamento com o extrato não alterou os níveis gênicos dessa enzima nos animais diabéticos tratados, apresentando redução quando comparado ao grupo CTLSAL e CTLEXT, com isso, podemos inferir que a atividade hipoglicemiante do extrato não foi através do estímulo da glicólise.

Como dito anteriormente, a insulina regula a glicemia principalmente através da síntese (glicogênese) e quebra (glicogenólise) de glicogênio nos tecidos periféricos,

principalmente em fígado. A glicogênio fosfatase (GP) e a glicose -6 fosfatase (G6Pase) são as principais enzimas responsáveis pela quebra de glicogênio (glicogenólise) e são reguladas pela presença de insulina (Vaidya *et al.*, 2013). Esse é um processo importante para manutenção da homeostase de glicose durante jejum prolongado, prevenindo assim a hipoglicemia. No entanto, em portadores de DM, devido à ausência ou defeito da ação da insulina, tais enzimas estão ativas e são responsáveis por aumentar ainda mais a glicemia dos pacientes e ao invés de ser algo benéfico acaba se tornando um grande problema. Por isso, inibidores de tais enzimas são um dos alvos terapêuticos para o DM (Wu *et al.*, 2009).

A análise do mRNA da GP mostrou diminuição significativa nos animais diabéticos tratados quando comparados ao grupo diabético tratado com salina, sugerindo portanto uma ação inibitória do extrato na via da glicogenólise. São escassos os estudos de plantas medicinais com atividade inibidora para essa enzima. Por isso a importância deste dado.

Nessa etapa do estudo, analisamos a expressão gênica e proteica da G6Pase, que também participa do processo de glicogenólise, e a PEPCK em fígado que são extremamente importantes no processo de gliconeogênese.

A gliconeogênese hepática é a formação de glicose a partir de compostos que não são carboidratos e é essencial para a manutenção da glicemia durante o período de jejum. As enzimas PEPCK e glicose-6-fosfatase (G6Pase) são as principais reguladoras deste processo. A atividade dessas enzimas é principalmente regulada pelos hormônios insulina e glucagon, sendo que a insulina inibe, e o glucagon estimula suas atividades. Assim, em casos como DM, devido à ausência da insulina e aumento dos níveis de glucagon, a atividade dessas enzimas está aumentada resultando no estímulo da gliconeogênese e consequente aumento da glicemia, prejudicando ainda mais o quadro de hiperglicemia do indivíduo (Collins, Xiong & Lupo, 2006).

A análise da expressão gênica e proteica da G6Pase e PEPCK mostrou aumento significativo no grupo STZSAL quando comparado com os grupos CTLSAL e CTLEXT. Em

contrapartida, o grupo STZEXT apresentou inibição da expressão desses genes após o tratamento quando comparado ao grupo STZSAL. Com isso podemos inferir que o extrato além de inibir a glicogenólise através da diminuição da expressão do mRNA da GP e da G6Pase, inibiu ainda, a gliconeogênese, agindo diretamente na via. Como dito anteriormente, além do estímulo da neoglicogênese, a ausência de insulina e consequente elevação dos níveis de glucagon elevam ainda mais a atividade de enzimas degradadoras de glicogênio e contribuindo para o estado crítico de hiperglicemia do indivíduo. Por isso, inibidores dessas enzimas são potenciais alvos terapêuticos para o controle da glicemia e melhora do quadro diabético.

Existem alguns estudos relatados na literatura que mostram a ação de plantas hipoglicemiantes através da inibição da via da gliconeogênese. Wu *et al.* (2009) demonstraram que o tratamento com geniposídeo na dose de 100, 200 e 400 mg/kg p.c., um composto extraído da *Gardenia jasminoides elis*, diminuiu glicemia de jejum, colesterol total e triglicerídeos em camundongos diabéticos na dose de 400 mg/kg p.c. Os autores avaliaram ainda a atividade, expressão gênica e proteica das enzimas GP e G6Pase e somente na dose de 400 mg/kg p.c. apresentou diminuição significativa quando comparado ao grupo diabético controle. Um outro trabalho publicado por Seo *et al.* (2016) mostrou que o tratamento com Ginseng preto teve ação hipoglicemiante através da modulação de vias importantes do metabolismo de glicose em fígado e músculo na dose de 900 mg/kg p.c. Em fígado, o tratamento foi capaz de inibir a expressão das enzimas PEPCK e G6Pase em animais diabéticos tratados. Tais resultados nos mostram o quanto os dados obtidos em nossa pesquisa são satisfatórios, visto que utilizamos extrato bruto e a dose utilizada em nosso tratamento foi menor em relação a essa citadas anteriormente.

A AMPK é responsável pelo controle do metabolismo de glicose e lipídeos e tem sido relacionada a um sensor intracelular de energia. Sabe-se que a AMPK é ativada por

estímulos como exercício, contração muscular e hormônios como adiponectina e leptina. Uma vez ativada no fígado, a AMPK inibe a gliconeogênese diminuindo a expressão das enzimas G6Pase e PEPCCK, além de inibir a síntese de lipídeos e a estimular a sua oxidação. Em nossos resultados, a análise expressão proteica da AMPK em fígado no grupo STZEXT aumentou significativamente em relação ao grupo STZSAL. Tal dado obtido, nos faz inferir que a inibição da G6Pase e PEPCCK apresentada anteriormente pode ter sido também pela ativação da AMPK, mostrando que o extrato agiu de forma sistêmica.

Pelo menos 100 produtos naturais citados na literatura e utilizados na medicina tradicional são capazes de inibir a AMPK, porém o mecanismo pelo qual eles fazem isso é desconhecido (Hardie, 2016). Alguns compostos como berberina inibem a cadeia respiratória enquanto o resveratrol a ATP sintase, o que pode ativar a AMPK indiretamente através da inibição da produção de ATP mitocondrial e aumentando a taxa AMP:ATP e/ou AMP:ADP, tendo portanto mecanismo similar as biguanidas (metformina). Muitos desses produtos naturais são compostos secundários da planta, ou seja, estão ligados à defesa contra infecções por patógenos ou herbivorismo por animais. A produção de venenos mitocondriais pelas plantas, mas em doses menores desses compostos podem causar uma inibição média da mitocôndria o que ativa a AMPK (Hardie, 2013; Jeong, Kim & Chung, 2014).

Não sabemos qual o mecanismo utilizado pelo extrato de *B. holophylla* para ativar a AMPK em fígado e são necessários mais estudos para elucidar este aspecto, mas em geral, a descoberta de novos ativadores dessa proteína é muito importante, pois ela está relacionada a diferentes processos metabólicos como inibição de gliconeogênese e inibição de oxidação de ácidos graxos em fígado além do estímulo da captação de glicose em músculo (Jeong, Kim & Chung, 2014).

Após a ingestão de carboidratos, o principal mecanismo para diminuição da glicose é o transporte de glicose estimulado pela insulina para dentro do músculo esquelético. Podendo

ser estocada na forma de glicogênio ou oxidada (glicólise) para produção de energia (Zheng, Xu & Fang, 2014).

Existem duas vias que quando ativadas resultam no transporte de glicose no músculo esquelético: a via PI3K/ AKT (dependente de insulina) e através da contração muscular (independente de insulina). A primeira se inicia com a ligação da insulina ao seu receptor específico e ativação de uma cascata de proteínas como IRS, PI3K, AKT, AS160 e consequentemente GLUT4. E a segunda, é através da ativação da AMPK pelo consumo de ATP. AMPK é ativada pela baixa taxa de ATP/AMP normalmente encontrada em situações de alta demanda energética e essa proteína pode ativar múltiplas cinases como ERK1/2 ou AS160. Devido a isso, as chaves da via independente de insulina são p38, ERK1/2 e AS160 (Xu *et al.*, 2015)

Defeitos na ação da insulina levam à diminuição da fosforilação das proteínas da via PI3K/AKT, o que resulta em diminuição da captação de glicose por tecidos periféricos, através da diminuição da translocação do transportador de glicose (GLUT4) (Camps *et al.*, 1992).

A análise da expressão gênica em músculo dos genes envolvidos na captação de glicose como a AKT, PI3K e GLUT4 mostrou que após a indução do diabetes com estreptozotocina os animais do grupo STZSAL apresentaram redução da expressão dos genes AKT e GLUT4 quando comparado aos grupos CTLSAL e CTLEXT. Já o grupo STZEXT após o tratamento com o extrato mostrou aumento da expressão de tais genes quando comparado ao grupo STZSAL. A expressão gênica da PI3K não apresentou diferença entre os grupos.

Em relação à expressão proteica da via PI3K/AKT em músculo, o grupo STZSAL apresentou significativa redução da expressão da AKT e GLUT4. Em contrapartida, após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla*, o grupo STZEXT apresentou aumento na

expressão dessas proteínas bem como das suas formas fosforiladas, indicando um possível aumento da captação de glicose em músculo através do aumento da expressão do transportador de glicose GLUT4 pela via PI3K/AKT o que provavelmente contribuiu para a atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *B. holophylla*.

O músculo esquelético utiliza como fonte preferencial de energia os ácidos graxos. Defeitos na sua oxidação contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina e obesidade. A AMPK é a responsável por ativar a oxidação de lipídeos de acordo com a demanda de energia, nutrientes e hormônios, fosforilando diretamente a isoforma específica de músculo Acetil-CoA Carboxilase-2 (ACC2) em serina-221. A ACC2 reside no interior da mitocôndria e é responsável por catalisar a carboxilação de AcetilCoA em MalonilCoA, um inibidor alostérico da carnitina palmitoitransferase-1 (CTP-1). Portanto, a fosforilação da ACC reduz a atividade enzimática que leva à redução da atividade do MalonilCoA, inibindo o CTP-1, resultando no aumento da oxidação de lipídeos (Dzamko *et al.*, 2008; Muoio & Newgard, 2008). Defeitos na ação da insulina diminuem a ativação da AMPK, levando à diminuição da oxidação de lipídeos e consequente aumento da lipogênese (Ruderman *et al.*, 2013).

Os camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e tratados com salina apresentaram diminuição da expressão total da AMPK em músculo enquanto que o grupo STZEXT, após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla*, mostrou aumento da expressão dessa proteína. Como dito anteriormente, o aumento da expressão da AMPK em músculo é importante por estimular a captação de glicose, bem como a oxidação de lipídeos (Kim *et al.*, 2008) o que corrobora com dados anteriores em nosso laboratório, onde camundongos tratados com o extrato bruto de *B. holophylla*, apresentaram redução dos níveis de colesterol total e triglicerídeos (Dados não publicados).

A captação de glicose além da via PI3K/AKT, pode ser estimulado através da ativação da AMPK, uma via independente da ação da insulina. Em dados apresentados anteriormente, viu-se que o grupo STZEXT apresentou aumento da expressão da proteína AMPK em músculo, o que também pode ter colaborado para o aumento da expressão de GLUT4 e consequentemente, no favorecimento da captação de glicose.

A sinalização da insulina é de suma importância para a manutenção da homeostase da glicose. Como dito anteriormente, a ligação da insulina ao seu receptor específico leva a uma cascata de eventos incluindo fosforilação e desfosforilação de proteínas envolvidas nesse processo. A família da fosfatases tirosina (PTPs) são importantes reguladores negativos do receptor de insulina, sendo a PTP1B a principal. A PTP1B é capaz de diminuir a sensibilidade do receptor de insulina, por isso, inibidores dessa proteína vêm sendo considerados alvos terapêuticos para a resistência à insulina e DM2 (Gonzales-Rodrigues *et al.*,2010).

A fim de buscar respostas para a atividade hipoglicemiante e sabendo da importância da busca de inibidores dessas fosfatases para o tratamento de DM, decidimos analisar a atividade inibitória do extrato na expressão proteica da PTP1B em músculo. Em nossos resultados, viu-se que após a indução ao diabetes, o grupo STZSAL apresentou aumento da expressão dessa proteína, em contrapartida, após o tratamento com o extrato bruto de *B. holophylla* os grupos CTLEXT e STZEXT apresentaram redução da expressão proteica da PTP1B, indicando um aumento da sensibilidade à insulina e, consequentemente, melhora no quadro de resistência à insulina, resultando na diminuição da glicemia.

Para elucidar o mecanismo de ação da *B. holophylla* em fígado e músculo utilizamos as técnicas de Real-time qPCR e Western blotting para obtermos a expressão gênica e proteica respectivamente e fazermos assim, uma análise mais profunda acerca da atividade do extrato. Diversos estudos na literatura tentam fazer uma correlação entre a expressão gênica e proteica e sabe-se que a expressão gênica em condições estacionárias não condiz com a

quantidade de proteínas traduzidas (Flory *et al.*, 2006; Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Wang, 2008). Algumas alterações observadas em nosso estudo de expressão gênica não se confirmaram para a expressão de proteínas. No entanto, a análise conjunta das expressões de mRNA e proteína nos permite verificar se o tratamento teve ação traducional ou pós-traducional. Com isso, analisando os resultados obtidos, podemos inferir que o tratamento com o extrato de *B. holophylla* foi mais efetivo pós-traducionalmente.

A digestão de carboidratos começa na boca com a ação da enzima α -amilase que é secretada pelas glândulas salivares, desempenhando importante papel na digestão de amido e glicogênio. No intestino, o pâncreas secreta a amilase pancreática, que quebra as moléculas de polissacarídeos em oligossacarídeos e as enzimas glicosidases (lactase, maltase e sucrase) completam essa quebra para unidades monossacarídicas, que são então absorvidas pelo corpo. Em uma dieta rica em carboidratos monossacarídeos, essa absorção é mais rápida e consequentemente maior será o pico de glicemia. As α -glicosidases compreendem enzimas denominadas isomaltase, maltase, maltase-ácida, glicosídeo sacarase entre outras (Figueiredo-González *et al.*, 2016)

A inibição da atividade das amilases e glicosidases e a consequente diminuição da glicemia pós-prandial é de suma importância para o tratamento de DM. Por essa razão, nos últimos anos, a busca por novos inibidores dessas enzimas têm aumentado, sejam compostos naturais ou sintéticos. Estudos recentes na literatura descrevem o potencial terapêutico de plantas como inibidoras de amilases e glicosidases, principalmente devido à presença de flavonoides e taninos (Barret & Udani, 2011; Senger *et al.*, 2012).

Com o objetivo de uma profunda investigação a respeito do mecanismo de ação do extrato para a sua atividade hipoglicemiante, realizamos experimentos junto ao Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, onde analisamos a atividade inibitória do extrato sobre enzimas importantes

para o processo de digestão, α -amilase pancreática e maltase. Nossos resultados mostram que o extrato bruto de *B. holophylla* foi capaz de inibir em 90% na concentração de 19,5 $\mu\text{g/ml}$ a amilase e maltase.

Atualmente, existem fármacos inibidores de amilases e glicosidases utilizadas no tratamento de DM, como acarbose, miglitol e a voglibose. A acarbose é um fármaco muito utilizado, pois inibe enzimas α -glicosidases no intestino e também α -amilase pancreáticas, no entanto estudos têm demonstrado que possuem baixa efetividade e muitos efeitos adversos (Rios *et al.*, 2015). Os resultados obtidos em nossos experimentos mostraram que o extrato bruto de *B. holophylla* foi um potente inibidor (CI_{50} = 28,04 $\mu\text{g/ml}$ para amilase e 43,01 $\mu\text{g/ml}$ para maltase) de α -amilases e α -glicosidases, tendo inclusive maior atividade que a própria acarbose para a enzima maltase (CI_{50} = 2,7 $\mu\text{g/ml}$ para amilase e 516,1 $\mu\text{g/ml}$ para maltase). Apesar da dose do extrato para inibição de 50% da atividade enzima ter sido maior que da acarbose para amilase, devemos levar em consideração que estamos comparando um composto purificado com um extrato bruto e mesmo assim, o extrato foi 100X mais eficiente para a inibição da maltase quando comparado com a acarbose. Segundo os testes de reversibilidade realizados com o extrato, vimos que a inibição da *B. holophylla* é do tipo lentamente reversível, ou seja, as moléculas do inibidor e as moléculas da enzima se unem por ligações não covalentes que por serem mais estáveis, são facilmente dissociadas, fazendo com que a enzima retome sua atividade posteriormente (Copeland, 2005).

Os testes *in vivo* em nosso laboratório mostraram que o grupo tratado com a acarbose e com o extrato de *B. holophylla* manteve a glicemia basal mesmo após a ingestão da solução de amido mostrando inibição para a sua quebra. O teste de absorção da maltose nos mostrou que o grupo tratado com o extrato de *B. holophylla* apresentou melhores resultados para inibição de α -glicosidases que a acarbose, mantendo a sua glicemia basal após a ingestão da solução de maltose.

Em suma, nosso estudo mostrou que o extrato foi capaz de inibir α -amilases e α -glicosidases. No entanto, ao comparar com a acarbose, notamos que seu efeito inibidor foi mais eficiente para α -glicosidases. Tais dados corroboram com os nossos resultados obtidos nos testes *in vitro*, onde obtivemos um valor de CI_{50} maior para inibição de α -glicosidases. Sabe-se que uma das causas para os desconfortos causados por medicamentos inibidores de α -amilase e α -glicosidase ocorre devido à inibição simultânea para essas duas enzimas resultado de fermentação anormal por bactérias no cólon por causa de carboidratos não digeridos (Dalar & Konczak, 2015; Figueiredo-González *et al.*, 2016). Por isso, o extrato de *B. holophylla* é um candidato atraente para inibidor dessas enzimas, diminuindo a glicemia pós-prandial com menores efeitos colaterais.

Como dito anteriormente, existem muitos fármacos utilizados para o tratamento do DM que podem agir diretamente na secreção de insulina, ou na sensibilização do receptor à sua ação, ou ainda inibindo enzimas digestivas como α -glicosidases e α -amilases. A metformina é o medicamento mais prescrito pelos médicos, juntamente com a insulina exógena e tem efeitos na diminuição da glicemia de jejum devido as suas ações em hepatócitos (diminuindo a gliconeogênese e glicogenólise e estimulando a glicogênese), em músculo, aumenta a captação de glicose. No entanto, diferentemente dos secretagogos, a metformina não altera a secreção de insulina. Um possível mecanismo de ação pelo qual a metformina exerce sua atividade farmacológica se dá pela ativação da enzima AMPK, como dito anteriormente (Junior *et al.*, 2008).

Por fim, com um tratamento de 14 dias na dose de 400 mg/kg, os camundongos diabéticos submetidos apresentaram redução da glicemia de jejum, devido ao aumento da síntese de glicogênio e diminuição da gliconeogênese e glicogenólise em fígado, inclusive modulando a via de sinalização de insulina por ativação de proteínas chaves. Em músculo, o tratamento com o extrato aumentou a expressão de proteínas importantes que favorecem a

captação de glicose através de duas vias importantes: PI3K/AKT e ativando a AMPK. Além disso, foi capaz de melhorar a sensibilidade à insulina através da inibição da PTP1B. Diante desses dados, nota-se que o extrato teve uma ação semelhante, senão melhor, que a metformina, visto que agiu através de diversas vias para que houvesse diminuição da glicemia. O extrato foi capaz de agir, ainda, como inibidor de glicosidases, diminuindo a glicemia pós-alimentar e tendo efeitos superiores em testes *in vitro* e *in vivo* que a acarbose, principal fármaco utilizado atualmente para controlar a glicemia pós-prandial.

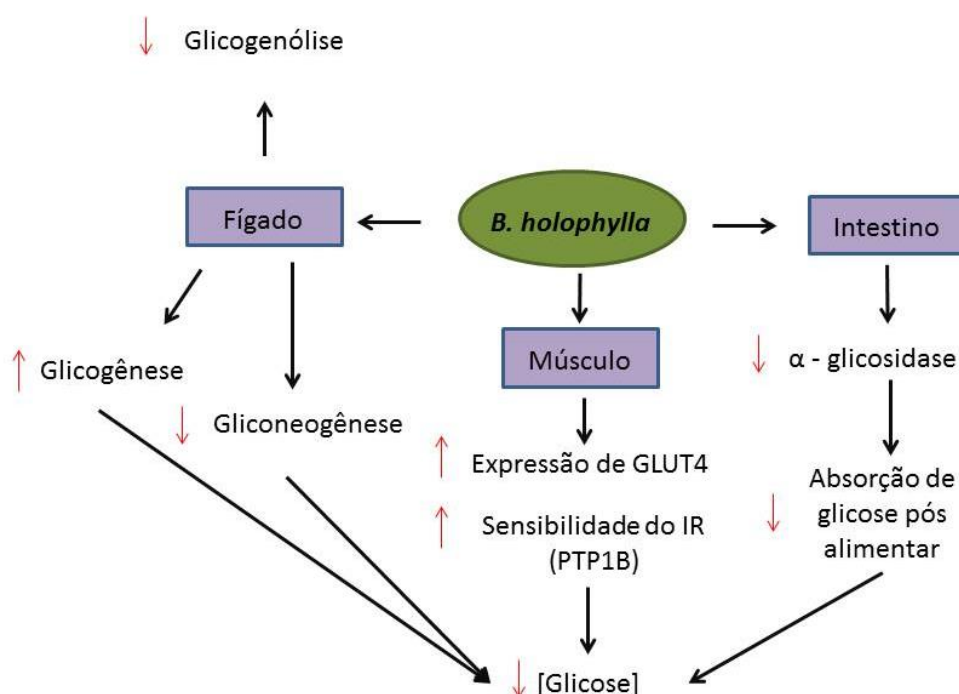


Figura 22. Mecanismo da ação hipoglicemiante do extrato bruto de *B. holophylla*. O extrato agiu através da inibição da gliconeogênese e glicogenólise e estimulou a glicogênese em fígado, estimulando a expressão de GLUT4 e melhorando a sensibilidade ao receptor de insulina em músculo e inibindo a absorção de glicose pós-prandial por meio da inibição de α -glicosidase.

Conclusões

6. Conclusões

Diante do exposto, nossos resultados aqui apresentados permitem concluir que o extrato de *B. holophylla* apresenta atividade hipoglicemiante:

- I. Estimulando a glicogênese em fígado, ativando genes e proteínas-chaves da via, como a G6Pase e PECK.
- II. Inibindo a expressão gênica e proteica de enzimas importantes nos processos de glicogenólise e gliconeogênese em fígado, melhorando, portanto, e contribuindo para a diminuição da hiperglicemia nos camundongos diabéticos.
- III. Além de agir no fígado, o extrato teve ação importante no músculo, favorecendo a captação de glicose ativando duas principais vias: PI3K/AKT, resultando no aumento da expressão gênica e proteica do transportador de glicose 4 (GLUT4) e aumentando os níveis proteicos da AMPK.
- IV. Melhorou a resistência à insulina através da diminuição da expressão da PTP1B, favorecendo também no aumento da captação de glicose.
- V. Diminuindo a glicemia pós-alimentar através da inibição α -glicosidase e α -glicosidase, contribuindo para a redução da hiperglicemia.

Os estudos aqui apresentados relatam de forma contundente a maioria dos possíveis mecanismos de ação do extrato de *B. holophylla* no tratamento de DM, no entanto, sabemos que esse é apenas o início de um longo caminho. Os dados presentes na literatura sobre o mecanismo de ação de plantas medicinais são escassos. Acreditamos que a pesquisa com plantas medicinais deve e precisa ser realizada de forma aprofundada acerca dos mecanismos de ação envolvidos, e assim quem sabe, poderemos contribuir de forma positiva para o

desenvolvimento de novos medicamentos e fármacos para a melhora na qualidade de vida das comunidades.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2012;35(1):S64–71.
2. Andrade-Cetto A, Vásquez RC. Gluconeogenesis inhibition and phytochemical composition of two *Cecropia* species. *J Ethnopharmacol*. 2010;130(1):93–7.
3. Bakke J, Haj FG. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;37:58–65.
4. Bansal P, Paul P, Mudgal J, G. Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, et al. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2012;64(6):651–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.12.009>
5. Barthel A, Schmoll D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;285(4):E685–92. Disponível em: <http://ajpendo.physiology.org/cgi/content/abstract/285/4/E685>
6. Barrett ML, Udani JK. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): A review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J*. 2011;10(1):24. Disponível em: <http://www.nutritionj.com/content/10/1/24>
7. Bastaki S. Diabetes mellitus and its treatment. *Int J Diabetes Metab*. 2005;13(3):111–34.
8. Babiloni PD, dos Santos MP, Aiko GM, de Lima Reis SR, Latorraca MQ, da Silva VC, et al. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae): Investigation in peripheral tissues. *J Ethnopharmacol*. 2010;131(1):135–9.
9. Bischof MG, Bernroider E, Krssak M, Krebs M, Stingl H, Nowotny P, et al. Hepatic Glycogen Metabolism in Type 1 Diabetes After. *Diabetes*. 2002;51(January):49–54.
10. Camps M, Castelló A, Muñoz P, Monfar M, Testar X, Palacín M, et al. Effect of diabetes and fasting on GLUT-4 (muscle/fat) glucose-transporter expression in insulin-sensitive tissues. Heterogeneous response in heart, red and white muscle. *Biochem J*. 1992;282(3):765–72. Disponível em: <http://www.biochemj.org/content/282/3/765.abstract>
11. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de Sinalização da Insulina. *Arq Bras Endocrinologia e Metabol*. 2002;46(4):419–25.
12. Cechinel Filho V. Chemical Composition and Biological Potential of Plants from the Genus *Bauhinia*. *Phytoterapy Res*. 2009;1354(November 2008):1347–54.
13. Cesaretti MLR, Kohlmann Junior O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):190–7.
14. Chang L, Chiang S-H. Insulin Signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*. 2006; 12:1-7. Disponível em: <http://www.molmed.org/content/pdfstore/article-3133.pdf>
15. Choi SM, Tucker DF, Gross DN, Easton RM, DiPilato LM, Dean AS, et al. Insulin regulates adipocyte lipolysis via an Akt-independent signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2010;

- 30 (21) : 5009–20. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2953052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Collins QF, Xiong Y, Lupo Jr. EG, Liu HY, Cao W. p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24336–44. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803882>
 17. Dalar A, Konczak I. Phenolic contents, antioxidant capacities and inhibitory activities against key metabolic syndrome relevant enzymes of herbal teas from *Eastern Anatolia*. *Ind Crops Prod.* 2013;44(July 2016):383–90.
 18. Da Silva VD, Nogueira RMB. Diabetes mellitus experimental induzido com aloxana em ratos Wistar. *Rev ciências Farm.* 2015;36(1):9–15.
 19. Dang PH, Nguyen N trung, Nguyen HX, Nguyen LB, Le TH, Do TN Van, et al. α -Glucosidase inhibitors from the leaves of *Embelia ribes*. *Fitoterapia.* 2015;100:201–7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2014.12.004>
 20. Da Silva MAB, Mela LVL, Ribeiro R V., de Souza JPM, Lima JCS, de Martins DTO, et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Brazilian J Pharmacogn.* 2010;20(4):549–62.
 21. Dias SL, Maciel TRC, Sablich GM. Diabetes tipo 2 na infância: revisão de literatura. *ConScientiae Saúde.* 2007;6(1):71–80. Disponível em: http://www.uninove.br/PDFs/Publicacoes/conscientiae_saude/csauade_v6n1/cnsv6n1_3g06.pdf
 22. Dzamko N, Schertzer JD, Ryall JG, Steel R, Macaulay SL, Wee S, et al. AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *J Physiol.* 2008;586(23):1929–34.
 23. Flory MR, Lee H, Bonneau R, Mallick P, Serikawa K, Morris DR, et al. Quantitative proteomic analysis of the budding yeast cell cycle using acid-cleavable isotope-coded affinity tag reagents. *Proteomics.* 2006;6(23):6146–57.
 24. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013; 1: 25-53.
 25. Gonzalez-Mujica F, Motta N, Estrada O, Perdomo E, Méndez J, Hasegawa M. Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O- α -(2"-galloyl)rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves. *Phyther Res.* 2005;19(7):624–7.
 26. Gonzales-Rodrigues Á, Gutierrez JAM, Sanz-gonza S, Ros M, Burks DJ, Valverde AM. Inhibition of PTP1B Restores IRS1-Mediated Hepatic Insulin Signaling in IRS2-Deficient Mice. *Diabetes.* 2010;59(March):588–99.
 27. Ghaemmaghami S, Huh W, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, et al. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature.* 2003;108(1997):737–41.
 28. Govorko D, Logendra S, Wang Y, Esposito D, Komarnytsky S, Ribnicky D, et al. Polyphenolic compounds from *Artemisia dracunculus* L. inhibit PEPCK gene expression and

gluconeogenesis in an H4IIE hepatoma cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1503–10.

29. Grahame HD. AMPK: A target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *Diabetes.* 2013;62(7):2164–72.

30. Gupta RK, Kumar D, Chaudhary AK, Maithani M, Singh R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *J Ethnopharmacol.* 2012;139(3):801–6. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111008993>

31. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção da Insulina: Efeito Autócrino da Insulina e Modulação por Ácidos Graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45:219–27.

32. HAN, Q. et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoide*. *Fitoterapia.* 2001;72: 86-88.

33. Hazarika R, Parida P, Neog B, Yadav R. Binding energy calculation of GSK-3 protein of human against some anti-diabetic compounds of *Momordica charantia* linn (Bitter melon). *Bioinformation.* 2012;8(6):251–4.

34. Hsu YJ, Lee TH, Chang CLT, Huang YT, Yang WC. Anti-hyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. *J Ethnopharmacol.* 2009;122(2):379–83.

35. Jeong KJ, Kim DY, Quan HY, Jo HK, Kim GW, Chung SH. Effects of eugenol on hepatic glucose production and AMPK signaling pathway in hepatocytes and C57BL/6J mice. *Fitoterapia.* 2014;93:150–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2013.12.023>.

35. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin - History, Biochemistry, Physiology and Pharmacology. *J. Assoc. Physicians India.* 2007; 55:19-25.

36. Júnior ACS, Ugolini MR, Santomauro AT, Souto RP do. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(1):120–5.

37. Kanuri G, Weber S, Volynets V, Spruss A, Bischoff SC, Bergheim I. Cinnamon extract protects against acute alcohol-induced liver steatosis in mice. *J Nutr.* 2009;139(3):482–7.

38. Kietzmann T, Ganjam GK. Glucokinase: old enzyme, new target. *Expert Opin Ther Pat.* 2005;15(6):705–13.

39. Kirsten VR, Saitovitch D. Modelos e xperimentais par a experimentais para o estudo do diabetes tipo 1. 2010;43(1):3–10.

40. Kumar R, Pate DK, Prasad SK, Sairam K, Hemalatha S. Antidiabetic activity of alcoholic leaves extract of *Alangium lamarckii* Thwaites on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med.* Hainan Medical College; 2011;4(11):904–9. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60216-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60216-2)

41. Kumar S, Kumar V, Rana M, Kumar D. Enzymes Inhibitors From Plants: An Alternate Approach To Treat Diabetes. *Pharmacogn Commun.* 2012;2(2):18–33.

42. Lerco MM, Spadella CT, Machado JLM, Schellini SA, Padovani CR. Caracterização de

um modelo experimental de Diabetes Mellitus , induzido pela aloxana em ratos . Acta Cir Bras. 2003;18(2):132–42.

43. Lyra R, Silva RDS, Montenegro Jr. RM, Matos MVC, César NJB, Maurício-da-Silva L. Prevalência de diabetes melito e fatores associados em população urbana adulta de baixa escolaridade e renda do sertão nordestino brasileiro. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2010;54(6):560–6.

44. Liu Q, Chen L, Hu L, Guo Y, Shen X. Small molecules from natural sources , targeting signaling pathways in diabetes. Biochim Biophys Acta. 2010;1799(10-12):854–65. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.06.004>

45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. 2001;408:402–8.

46. Machado UF. Transportadores de Glicose. Arq Bras Endocrinol Metab. 1998;42(6):413–21.

47. Malviya N, Jain S, Malviya S. Antidiabetic potential of medicinal plants. Acta Pol Pharm - Drug Res. 2010;67(2):113–8.

48. Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biol Med. 2011;3(2 SPECIALISSUE):232–49.

49. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 28, n. 3, p. 577-599, 2000.

50. Ministério do meio ambiente. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado - PPCerrado. Vol. 55, Ministério do Meio Ambiente. 2015. p. 132. Disponível em: http://www.mma.gov.br/images/arquivos/florestas/controle_e_prevencao/PPCerrado/PPCerrado_2fase.pdf <http://siscom.ibama.gov.br/monitorabiomas/>

51. Morikawa T. Search for bioactive constituents from several medicinal foods : hepatoprotective , antidiabetic , and antiallergic activities. 2007;112–26.

52. Muoio DM, Newgard CB. Fatty acid oxidation and insulin action: When less is more. Diabetes. 2008;57(6):1455–6.

53. Negrão AB, Licínio J. Leptina: o Diálogo entre Adipócitos e Neurônios. Arq Bras Endocrinol Metab. 2000;44:205–14.

54. Negri G. Diabetes melito : plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. 2005;41.

55. Oliveira HWC. Cerrado e Plantas Medicinais : Algumas Reflexões sobre o Uso e a. 2011;

56. Petersen KF, Laurent D, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI. Mechanism by which glucose and insulin inhibit net hepatic glycogenolysis in humans. J Clin Invest. 1998;101(6):1203–9.

57. Picot CMN, Subratty AH, Mahomoodally MF. Inhibitory Potential of Five

Traditionally Used Native Antidiabetic Medicinal Plants on α -Amylase, α -Glucosidase, Glucose Entrapment, and Amylolysis Kinetics In Vitro. *Adv Pharmacol Sci*. 2014;2014:1–8.

58. Pizziolo VR, Brasileiro BG, Oliveira TT, Nagem TJ. Plantas com possível atividade hipolipídica: Uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. *Rev Bras Plantas Med*. 2011;13(1):98–109.

59. Prabhakar PK, Doble M. A target based therapeutic approach towards diabetes mellitus using medicinal plants. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4:291–308.

60. Rios JL, Francini F, Schinella GR. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Planta Med*. 2015;2015:1–20.

61. Rodríguez P, González-Mujica F, Bermúdez J, Hasegawa M. Inhibition of glucose intestinal absorption by kaempferol 3-O- α -rhamnoside purified from *Bauhinia megalandra* leaves. *Fitoterapia*. Elsevier B.V.; 2010;81(8):1220–3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.08.007>

62. Ruderman NB, Kapeller R, White MF, Cantley LC. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase by insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(4):1411–5. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=53485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

63. Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2013;123(7):2764–72.

64. Sama K, Murugesan K, Sivaraj R. In vitro α -amylase and α -glucosidase inhibition activity of crude ethanol extract of *Cissus arnottiana*. *Pelagia Res Libr*. 2012;2(4):550–3.

65. Senger MR, Gomes A, Ferreira B, Kaiser CR, Ferreira F, Silva FP. Kinetics Studies on the Inhibition Mechanism of Pancreatic α -Amylase by Glycoconjugated 1 H -1, 2, 3-Triazoles: A New Class of Inhibitors with Hypoglycemic Activity. *ChemBioChem*. 2012;14:1584–93.

66. Singh SN, Vats P, Suri S, Shyam R, Kumria MML, Ranganathan S, et al. Effect of an antidiabetic extract of *Catharanthus roseus* on enzymic activities in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2001;76(3):269–77.

67. Sun Y, Liu S, Ferguson S, Wang L, Klepcyk P, Yun JS, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase overexpression selectively attenuates insulin signaling and hepatic insulin sensitivity in transgenic mice. *J Biol Chem*. 2002;277(26):23301–7.

68. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537–46.

69. Szkudelski T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2012;237(5):481–90. Disponível em: <http://ebm.sagepub.com/content/237/5/481.full>

70. Udayakumar R, Kasthuriengan S, Mariashibu TS, Rajesh M, Anbazhagan VR, Kim SC, et al. Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of *Withania somnifera* root and leaf extracts on alloxan-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*. 2009;10(5):2367–82.

71. Vaidya HB, Ahmed AA, Goyal RK, Cheema SK. Glycogen phosphorylase- α is a common target for anti-diabetic effect of iridoid and secoiridoid glycosides. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(4):530–40.
72. Seo Y-S, Shon M-Y, Kong R, Kang O-H, Zhou T, Kim D-Y, et al. Black ginseng extract exerts anti-hyperglycemic effect via modulation of glucose metabolism in liver and muscle. *J Ethnopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2016;190:231–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27260409>
73. Vareda PMP, Saldanha LL, Camaforte NA de P, Violato NM, Dokkedal AL, Bosqueiro JR. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k / Akt Insulin Signaling Pathway. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2014;2014:1–10.
74. Vasconcelos CFB, Maranhão HML, Batista TM, Carneiro EM, Ferreira F, Costa J, et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 2011;137(3):1533–41.
75. Von Wilamowitz-Moellendorff A, Hunter RW, García-Rocha M, Kang L, López-Soldado I, Lantier L, et al. Glucose-6-phosphate-mediated activation of liver glycogen synthase plays a key role in hepatic glycogen synthesis. *Diabetes.* 2013;62(12):4070–82.
76. Xu PT, Song Z, Zhang WC, Jiao B, Yu Z Bin. Impaired translocation of GLUT4 results in insulin resistance of atrophic soleus muscle. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
77. World Health Organization. Global Report on Diabetes. world Heal Organ [Internet]. 2016;1–88. Available from: http://www.who.int/about/licensing/nhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
78. Wu S, Wang G, Liu Z, Rao JJ, Lu L, Xu W, et al. Effect of geniposide, a hypoglycemic glucoside, on hepatic regulating enzymes in diabetic mice induced by a high-fat diet and streptozotocin. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;12:202–8.
78. Wu J.E.H. Lithospermoside and dasycarponin, cyanoglucosides from *Thalictrum*. *Journal of Natural Products*, 1979; 42(3): 500–511.
79. Yamazaki RKEY. Redução da glicemia em ratos diabéticos tratados com sais de vanádio peroxidados. 2004.
80. Zheng X, Xu M, Fang Q. Role of AMPK α in skeletal muscle glycometabolism regulation and adaptation in relation to sepsis. *Biomed Res Int.* 2014.

Apêndice

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **520-CEUA**, sobre
"INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO
EXTRATO BRUTO DE BAUHINIA HOLOPHYLLA EM
FÍGADO, MÚSCULO ESQUELÉTICO E TECIDO ADIPOSEO
EM MODELO DE DIABETES TIPO 1 INDUZIDOS 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, 04 de julho de 2013.



Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano
Presidente da CEUA