

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2021.



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITO DO LITOSPERMOSÍDEO EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS DO TIPO 1 INDUZIDOS POR
ESTREPTOZOTOCINA

Aislan Quintiliano Delgado

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de processos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Delgado, Aislan Quintiliano.

Efeito do litospermosídeo em camundongos diabéticos do tipo 1 induzidos por estreptozotocina / Aislan Quintiliano Delgado. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Roberto Bosqueiro Capes:
20702000

1. Diabetes mellitus. 2. Fígado. 3. Hipoglicemiantes.

Palavras-chave: Cianoglicosídeo; Diabetes mellitus; Fígado; Hipoglicemiante.

Dedico esse trabalho a Deus, que me capacitou para a realização do mesmo, e aos meus pais, Rosenwald e Edinês, pelo amor, paciência dedicação e apoio em todo meu período acadêmico.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, por estar constantemente me capacitando e dando saúde para poder realizar essa etapa em minha vida.

Agradeço aos meus pais, Rosenwald, Edinês, minha irmã Stephanie e minha vó Inês, grandes incentivadores da minha carreira acadêmica, pelos ensinamentos, dedicação, carinho, amor e apoio indispensáveis.

Agradeço à minha família, principalmente, ao Tio Edson, à Tia Tania, à prima Júlia e meu cunhado Kelsey.

Agradeço em especial meu orientador José Roberto Bosqueiro, por ter acreditado no meu trabalho, pela paciência, amizade, por compartilhar todo seu vasto conhecimento com os pesquisadores mais jovens e pelo exemplo de dedicação profissional. Muito obrigado pela oportunidade de tê-lo como orientador.

Agradeço imensamente a todos os colaboradores que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho. Em especial ao pessoal do laboratório de Química de Produtos Naturais da Unesp- Bauru, Laboratório de Bioquímica da Usp-Bauru e do laboratório de ciências farmacêuticas da universidade de Genebra.

Agradeço a todos os professores que participaram da banca do exame de qualificação, bem como a todos que aceitaram compor a banca de defesa de dissertação, pela dedicação de tempo e pelas contribuições para esse trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

Agradeço a FAPESP, CAPES e CNPQ, pelos auxílios financeiros que viabilizaram o desenvolvimento desta dissertação.

A todos, meu muito obrigado!

“Até aqui me ajudou o Senhor”

1 Samuel 7:12

RESUMO

O termo *Diabetes mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica, caracterizada por hiperglicemia crônica, resultante da falta de produção de insulina e/ou de resistência à ação do mesmo. Atualmente, muitos medicamentos são utilizados para tratar diabetes, incluindo insulina exógena e drogas alopáticas como biguanidas, sulfonilureias e inibidores de alfa-glicosidases. Entretanto, possuem muitos efeitos adversos que diminuem a qualidade de vida do paciente e a resposta por uso prolongado. Somado ao fato de que a incidência do DM vem se elevando de modo alarmante, os estudos com plantas que possuam efeitos antidiabéticos vêm despertando o interesse por parte dos pesquisadores. Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa sobre o efeito hipoglicemiante do extrato de folhas de *Bauhinia holophylla* nos permitiu identificar e isolar a molécula responsável pelo efeito hipoglicemiante. Tal molécula é denominada litospermosídeo, um cianoglicosídeo não-cianogênico. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização geral do efeito do litospermosídeo no quadro diabético de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina e tratados por 14 dias nas doses 1, 5, 10 e 20mg/Kg, na busca de uma alternativa para o tratamento do diabetes. Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, que foram separados em 1 grupo normoglicêmico e 5 grupos diabéticos. A glicemia de jejum mensurada nos dias 7 e 14, e a ingestão hídrica e alimentar e o peso corpóreo foram medidos diariamente. No 14º dia, foram analisadas a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose. Após os 14 dias, os animais foram eutanasiados e tiveram órgãos pesados; foram retirados fragmentos de músculo e fígado para a mensuração de glicogênio hepático e muscular, do fígado para análise proteômica, e sangue foi coletado para análise dos parâmetros bioquímicos. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação entre múltiplos resultados paramétricos foi utilizado ANOVA de dois caminhos seguido do pós teste de *Tukey*. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. O tratamento com o litospermosídeo durante quatorze dias não se mostrou tóxico aos animais e diminuiu a glicemia em jejum já no 7º dia de tratamento. Também aumentou a sensibilidade à insulina e maior tolerância à glicose. Impediu também a proteólise muscular e conseqüentemente a perda de massa muscular, assim como reduziu a perda de peso corpóreo. Houve a diminuição do colesterol total e os triglicerídeos, aumento do colesterol HDL e a albumina sérica, além de aumentar o armazenamento de glicogênio hepático. Através das análises proteômica pode-se perceber que o litospermosídeo foi capaz de amenizar as anomalias no metabolismo lipídico e

energético causados pelo diabetes. O litospermosídeo foi capaz de melhorar o quadro diabético em camundongos induzidos por estreptozotocina.

Palavras-chave: Cianoglicosídeo, *Diabetes mellitus*, fígado, hipoglicemiante.

Abstract

The term Diabetes mellitus (DM) describes a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia resulting from lack of insulin production and/or resistance to insulin action. Many medications are currently being used to treat diabetes, including exogenous insulin and allopathic drugs such as biguanides, sulfonylureas, and alpha-glycosidase inhibitors. However, they have many adverse effects that decrease the quality of life of the patient and the response for prolonged use. In addition to the fact that the incidence of DM is rising alarmingly, studies with plants that have anti-diabetic effects have aroused the interest of the researchers. Previous studies by our research group on the hypoglycemic effect of *Bauhinia holophylla* leaf extract have allowed us to identify and isolate the molecule responsible for the hypoglycemic effect. Such a molecule is called lithospermoside, a non-cyanogenic cyanoglycoside. The aimed of this study was to characterize the lithospermoside effect in the diabetic group of diabetic mice induced by streptozotocin and treated for 14 days at doses 1, 5, 10 and 20mg / kg, in the search for an alternative treatment of diabetes. Male Swiss mice were used, which were separated into 1 normoglycemic group and 5 diabetic groups. Fasting glycemia measured on days 7 and 14, and water and food intake and body weight were measured daily. On the 14th day, insulin sensitivity and glucose tolerance were analyzed. After 14 days, the animals were euthanized and had heavy organs; muscle and liver fragments were collected for the measurement of hepatic and muscular glycogen from the liver for proteomic analysis, and blood was collected for analysis of biochemical parameters. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. For comparison between multiple parametric results, two-way ANOVA was used followed by *Tukey's* test post. The level of significance was set at $p < 0.05$. Treatment with lithospermoside for fourteen days did not prove to be toxic to the animals and decreased fasting glycemia by the 7th day of treatment. It also increased insulin sensitivity and increased glucose tolerance. It also prevented muscle proteolysis and consequently loss of muscle mass, as well as reduced body weight loss. There was a decrease in total cholesterol and triglycerides, an increase in HDL cholesterol and serum albumin, and an increase in the storage of hepatic glycogen. Through proteomic analysis it can be seen that lithospermoside was able to alleviate the anomalies in lipid and energy metabolism caused by diabetes. Lithospermoside was able to improve the diabetic condition in streptozotocin-induced mice.

Key Words: Cyanoglycoside, *Diabetes mellitus*, liver, hypoglycemic

Lista de Ilustrações

- Figura 1:** Estrutura molecular do composto litospermosídeo, um cianoglicosídeo não-cianogênico isolado das folhas de *Bauhinia holophylla*.....20
- Figura 2:** Glicemia de jejum (mg/dL) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....30
- Figura 3:** Glicogênio hepático (mg%) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....31
- Figura 4:** Glicogênio muscular (mg%) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....33
- Figura 5:** Ingestão alimentar (g ração/100g peso corpóreo) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias35
- Figura 6:** Ingestão hídrica (mL/animal) de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....35
- Figura 7:** Teste de tolerância à glicose de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....36
- Figura 8:** Gráfico de área sob a curva a partir da glicemia no ipGTT de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias37
- Figura 9:** Teste de sensibilidade à insulina de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias.....38
- Figura 10:** Gráfico de área sob a curva a partir da glicemia no ipGTT de camundongos normoglicêmicos e diabéticos tratado com salina ou litospermosídeo durante 14 dias38

Lista de Tabelas

- Tabela 1-** Efeito da administração de salina ou litospermosídeo sobre o peso dos órgãos de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina 33
- Tabela 2-** Efeito da administração de salina ou litospermosídeo sobre o peso corpóreo de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina 34
- Tabela 3-** Efeito da administração de salina ou litospermosídeo sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina..... 40
- Tabela 4-** Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos diabéticos do tratado com litospermosídeo 10 mg/Kg (DL10) em comparação com o grupo normoglicêmico tratado com salina (CS)..... 41
- Tabela 5-** Proteínas identificadas no fígado de camundongos normoglicêmicos tratados com salina(CS)..... 42
- Tabela 6-** Proteínas identificadas no fígado de camundongos diabéticos tratados com litospermosídeo a 10 mg/Kg (DL10). 42
- Tabela 7-** Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos diabéticos do grupo tratado com litospermosídeo 10 mg/Kg (DL10) em comparação com o grupo diabético tratado com salina (DS). 42
- Tabela 8-** Proteínas identificadas no fígado de camundongos diabéticos tratados com litospermosídeo a 10 mg/Kg (DL10). 43
- Tabela 9-** Proteínas identificadas com alteração de expressão no fígado de camundongos diabéticos tratados com salina (DS) em comparação com o grupo normoglicêmico tratado com salina (CS)..... 43
- Tabela 10-** Proteínas identificadas no fígado de camundongos diabéticos tratados com salina (DS). 44
- Tabela 11-** Proteínas identificadas no fígado de camundongos normoglicêmicos tratados com salina (CS). 44

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADA	Associação Americana de Diabetes
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Transaminase
ATP	Adenosina Trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CS	Grupo controle normoglicêmico tratado com salina
DKD	Doença renal diabética
DL1	Grupo diabético tratado com litospermosídeo 1mg/kg
DL5	Grupo diabético tratado com litospermosídeo 5mg/kg
DL10	Grupo diabético tratado com litospermosídeo 10mg/kg
DL20	Grupo diabético tratado com litospermosídeo 20mg/kg
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DMT1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo1
DMT2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DS	Grupo diabético tratado com salina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Et al.	E outros
Glut2	Transportador de glicose do tipo 2
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
Kg	Quilogramas
KOH	Hidróxido de Potássio

M	Molar
Mg	Micrograma
ml	Microlitros.
Mm	Micrometro
mM	Millimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
nm	Nanômetros
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
RI	Resistência à Insulina
SEM	erro padrão da média
STZ	Estreptozotocina

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Insulina	15
1.2 <i>Diabetes Mellitus</i>	16
1.3 Diabetes Experimental	17
1.4 Gênero <i>Bauhinia</i>	18
1.5 Litospermosídeo.....	19
2. Objetivo Geral.....	20
2.1 Objetivo Específico	20
3. Material e Método.....	22
3.1 Obtenção do litospermosídeo	22
3.2 Animais.....	22
3.3 Indução ao Diabetes	24
3.4 Tratamento com litospermosídeo	24
3.5 Glicemia de jejum	24
3.6 Ingestão Hídrica e alimentar	25
3.7 Peso corpóreo.....	25
3.8 Teste intraperitoneal de tolerância à insulina (IGITT)	25
3.9 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (IpITT).....	25
3.10 Glicogênio Hepático e Muscular	26
3.11 Obtenção do Soro.....	26
3.12 Parâmetros Bioquímicos	27
3.13 Análise proteômica do tecido hepática.....	27
3.13.1 Preparo da amostra.....	27
3.13.2 Análise por UPCC acoplada a espectrometria de massa	28
3.14 Análise Estatística	28
4. Resultados	29
4.1 Glicemia.....	29
4.2 Glicogênio hepático	30
4.3 Glicogênio muscular	31
4.4 Peso dos órgãos.....	32
4.5 Peso corpóreo.....	33
4.6 Ingestão Alimentar e Hídrica	34
4.7 IpGTT	37
4.8 IpITT.....	37
4.9 Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos	39
4.10 Análise proteômica do fígado	40
5. Discussão	45
6. Conclusão	53

7. Referência Bibliográfica	54
8. Anexos	59

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insulina

A insulina é o hormônio anabólico mais conhecido e essencial para a manutenção da homeostase da glicose, além de atuar na diferenciação e crescimento celular. A insulina é secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis de glicose e aminoácidos no sangue após as refeições (Carvalho *et al.*, 2002). Seus efeitos ocorrem através de receptores localizados na membrana celular de tecidos responsivos à insulina, como músculo estriado, fígado e tecido adiposo (Argilés & Lopez-Soriano, 2001). A insulina atua em vários processos metabólicos, que incluem o controle do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Anderson *et al.*, 1994).

A secreção da insulina pelas células β sofre influência de vários fatores, como os níveis plasmáticos de glicose, de somatostatina, de glucagon e pelos sistemas nervoso simpático e parassimpático. A glicose é o principal estimulador da secreção de insulina, e tem sua entrada nas células β proporcionada pelo transportador de glicose 2 (GLUT 2). A elevação da concentração de glicose e sua metabolização aumentam a concentração intracelular de ATP. Como resultado, os canais de potássio sensíveis ao ATP fecham-se causando despolarização da membrana e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. Esse fluxo de cálcio é percebido por proteínas de ligação ao cálcio, o que impulsiona o deslocamento de grânulos secretórios ao longo dos microtúbulos que levam à fusão das vesículas com a membrana plasmática e exocitose do hormônio (Bressler & Johnson, 1997; Kalwat, M. A & Cobb, M. H, 2017).

A homeostase da glicose é controlada pela insulina através de inúmeros processos, que incluem a síntese de glicogênio (glicogênese), ou sua degradação devido a períodos de jejum (glicogenólise), a quebra de glicose para liberação de energia (glicólise), ou ainda a inibição da produção de glicose pelo fígado através de compostos que não são carboidratos

(gliconeogênese) em situação de jejum intenso ou ainda doenças, como o *Diabetes mellitus* (DM) (Carvalho *et al.*, 2002).

Defeitos na ação ou secreção da insulina podem levar à instalação do DM e têm como consequência a hiperglicemia crônica, desequilíbrio no metabolismo de proteínas e lipídeos, além de poliúria, polifagia e polidipsia (Carvalho *et al.* 2002).

1.2 Diabetes Mellitus

O DM é uma desordem metabólica que tem a hiperglicemia crônica como característica devido a defeitos na secreção, ação de insulina ou ambos. Tal desordem resulta em um desequilíbrio nos metabolismos de carboidratos, lipídeos e proteínas, acarretando em grandes complicações em longo prazo (Varela *et al.*, 2014).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que o diabetes afeta aproximadamente 422 milhões de pessoas ao redor do mundo, e estima-se que afetará cerca de 642 milhões em 2040, devido ao crescimento populacional, ao envelhecimento, à urbanização, ao sedentarismo e ao aumento da obesidade. O DM está entre as dez principais causas de morte nos países ocidentais, responsável por 1,5 milhões 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. Em 2016 16 milhões de pessoas foram acometidas pelo DM, sendo a mesma responsável pela morte de 72,2 mil brasileiros com mais de 30 anos, representando 6% de todas as mortes no Brasil. A OMS ainda acrescenta que 1 mês de tratamento com insulina custaria aos brasileiros o equivalente ao seu salário de 2,8 dias de trabalho.

De acordo com a etiologia, podemos citar duas classes clínicas principais que são

classicamente descritos: *Diabetes mellitus* tipo 1 (DMT1), caracterizado pela total deficiência na produção de insulina, resultado de destruição autoimune das células β pancreáticas, representando de 5 a 10% de todos os casos de diabetes. Afeta principalmente crianças e jovens que necessitam da administração diária de insulina exógena para a manutenção da homeostase da glicemia. O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), que se instala pela ação ineficiente da insulina nos tecidos periféricos (Öztürk *et al.*, 1996; WHO, 2016), é mais frequente, compreendendo cerca de 95% dos casos, e tende a se manifestar em indivíduos adultos, com idade superior a 40 anos, e que possuem dieta inadequada associada ao estilo de vida sedentário (Dias *et al.*, 2007). A resistência à insulina (RI) se instala quando as células alvo não respondem aos níveis normais de insulina no sangue e, por isso, a elevação dos níveis de insulina é necessária para assim manter a normoglicemia. Entretanto, isso resulta em mais insulina produzida pelo pâncreas, ocasionando a hiperinsulinemia. Com o decorrer do tempo, a compensação de células β pancreáticas para a resistência à insulina se minimiza, tendo como resultado o declínio exponencial da função dessas células, resultando na instalação do DMT2. As principais características da resistência à insulina são o aumento da lipólise no tecido adiposo, aumento da gliconeogênese no fígado e diminuição da absorção da glicose pelo músculo (Kasuga, 2006).

A hiperglicemia crônica leva a várias complicações, como deficiências renais, vasculares, oftálmicas, neurológicas, perda de peso, problemas digestivos, alterações no processo de cicatrização de lesões e amputações em casos mais graves (Ciardullo *et al.*, 2004).

1.3 Diabetes Experimental

A estreptozotocina (STZ) é um produto químico amplamente utilizado na indução de diabetes experimental em roedores e é altamente específica, agindo seletivamente sobre as

células β , nas quais penetra através do transportador de glicose GLUT2 (Elsner *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2015). A STZ causa danos ao DNA, através da formação de óxido nítrico (NO), um agente citotóxico, levando à morte das células β pancreáticas. O efeito diabetogênico da STZ provém da alcalinização do DNA celular e a subsequente ativação da poli-ADP ribose sintetase que causa depleção rápida e letal de NAD nas células- β pancreáticas, com redução no nível de ATP e posterior inibição da síntese e secreção da insulina (Bennett, 1981; Bolzán, 2002; Szkudelski, 2001). A ação simultânea do óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio também podem contribuir para a fragmentação do DNA e outras alterações deletérias causadas pela STZ (Szkudelski, 2001).

Sua atividade caracteriza-se por apresentar um efeito de natureza trifásica, com um período inicial (2 a 4 horas) de hiperglicemia, ao inibir a liberação de insulina, um período intermediário (7 a 9 horas) de hipoglicemia através da ação ofensiva sobre as células β com a liberação da insulina que estava armazenada e um período final caracterizado por apresentar um quadro irreversível de hiperglicemia (24 horas após a indução) (Rerup, 1970).

1.4 Gênero *Bauhinia*

O gênero *Bauhinia*, pertence à família Fabaceae, compreendendo aproximadamente 300 espécies. Muitas destas plantas são usadas via oral, em forma de chás ou outras preparações fitoterápicas de suas cascas e folhas, no tratamento de diversas doenças, como diabetes, agindo como anti-inflamatório, diurético e analgésico. São popularmente conhecidas como “Pata-de-vaca” ou “Unha-de-boi” (Cechinel Filho, 2002; Vasconcelos *et al.*, 2004).

Plantas pertencentes ao gênero *Bauhinia* e seus compostos isolados vêm despertando grande interesse por parte da comunidade científica nos últimos anos desde que alguns estudos mostraram a sua eficácia no tratamento de doenças, dentre elas o diabetes (Da Silva & Cechinel Filho, 2002; Da Silva *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2018).

Foram realizados estudos fotoquímicos e farmacológicos demonstrando que plantas do gênero *Bauhinia* possuem significativas quantidades de glicosídeos, esteroídicos, triterpenos, lactonas e flavonoides. Por mais que muitos compostos sejam conhecidos, pouco se conhece sobre a atividade farmacológica das plantas do gênero *Bauhinia* (Silva K & Cechinel, 2002).

Ribeiro *et al.* (2017) demonstraram *in vitro* que o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. não apresenta efeitos citotóxicos e ainda mostrou efeitos protetores que podem estar associados a uma possível atividade quimiopreventiva contra agentes carcinogênicos.

Rozza *et al.* (2015) verificaram que o extrato bruto de *B. holophylla* apresenta atividade antiúlcera principalmente por diminuir o estresse oxidativo e atenuar a resposta inflamatória, sem induzir efeitos adversos.

1.5 Litospermosídeo

O fracionamento do extrato bruto de *B. holophylla*, realizado através de técnicas cromatográficas em parte no Lab. de Química de Produtos Naturais (FC/UNESP/Bauru) e em parte no Lab. de Fitoquímica e Produtos Naturais Bioativos (Universidade de Genebra), revelou um composto majoritário presente no extrato. A identificação de tal composto revelou tratar-se de um cianoglicosídeo não-cianogênico, o litospermosídeo (Fig. 1). Os compostos conhecidos como cianoglicosídeos são encontrados em fontes naturais, derivados de várias rotas de biossíntese em plantas. Estes compostos são caracterizados pela presença de uma unidade de açúcar, normalmente glicose, ligada à cianidrina e apresentam fórmula molecular genérica $C_nH_nNO_n$ de baixo peso molecular. A maior parte dos cianoglicosídeos na natureza é tóxica, pois através de reações enzimáticas de hidrólise são capazes de gerar HCN (Yamasaki, 1999). São conhecidos, então, como cianoglicosídeos cianogênicos. Já outra classe, a dos cianoglicosídeos não-cianogênicos, como litospermosídeo, formam um pequeno grupo de substâncias que não apresentam o grupo nitrila adjacente à ligação do açúcar, o que os torna não-cianogênicos. Outros compostos não-cianogênicos com estruturas similares à do

6. CONCLUSÃO

O tratamento com o litospermosídeo é capaz de aumentar a sensibilidade à glicose e à insulina de camundongos diabéticos do tipo 1 induzidos por estreptozotocina. Também se mostrou eficiente em diminuir a ingestão hídrica, alimentar e a perda de peso característica do diabetes. O tratamento com litospermosídeo foi responsável pelo aumento dos níveis de glicogênio hepático e redução da glicemia. Diminuiu os triglicérides e o colesterol total e aumentando o colesterol HDL. O tratamento também pode ter atenuado as lesões renais causadas pelo diabetes, resultando assim, em aumento da albumina sérica. O tratamento também amenizou as anomalias causadas pelo diabetes nos metabolismos de lipídios e energético, já que nas análises da proteômica o grupo tratado com litospermosídeo teve diminuição das proteínas relacionada a beta-oxidação e gliconeogênese, quando comparado com o grupo diabético tratado com salina. Com os resultados obtidos é possível postular que o litospermosídeo pode ser considerado como candidato à melhor e mais profunda investigação na busca de uma opção terapêutica para melhora no quadro diabético.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA – American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes Mellitus*. **Diabetes Care**. v.34, n.1, p. 565-569, 2011.

AITKEN, M. *et al.* Global outlook for medicines through 2018. **IMS Institute for Healthcare Informatics**.p. 1-42, 2014.

AKANJI.; *et al.*, Dietary salt and the glycaemic response to meals of diferente fibre contente.

AMARAL, A. C. F, et al. Coletânea científica de plantas de uso medicinal. **Cenargen, Rio De Janeiro: FIOCRUZ**, 2005.

ANDERSON, L.C.; SULEIMAN, A.H.; GARRET, J.R. Morphological effects of diabetes on the glandular ducts and acini of the rat submandibular gland. **Microsc. Res. Tech.** v.27,p.61-70,1994.

ARGILÉS, J.M.; LÓPEZ-SORIANO, F.J. Insulin and câncer (review). **Int.J.Oncol.** v.18.nº04 p.683-687, 2001.

BABU, P. S. et al. Nymphayol increases glucose-stimulated insulin secretion by RIN-5F cells and GLUT4- mediated insulin sensitization in type 2 diabetic rat liver. **Chem. Biol. Interact.** v. 226, p. 72-81, 2015.

BARATA, J. **Terapêuticas alternativas de origem botânica - efeitos adversos e interações medicamentosas**. Lisboa: Lidel edições, 2008.

BAYNES, J.W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**. v.48, n.1, p. 1-9, 1999.

BENT, S., M.D., KO, R. e PHARM, D. Commonly Used Herbal Medicines in the United States: A Review. **Am. J. Med**.p.478-485, 2003.

BENNETT, R.A.; PEGG, A.E.; Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. **Cancer Res**. v.41.p.2786-2790, 1981.

BOLZÁN, A.D.; BIANCHI, M.S. Genotoxicity of streptozotocin. **Mutat. Res.** v.512.p.121-134, 2002.

BORGES, K.B.; BAUTISTA, H.B.; GUILERA, S. Diabetes-utilização de plantas medicinais como forma opcional de tratamento. **Rev. Bras. Farm.** v.2, p.12-20, 2008.

BRAGA, C.P. **Aplicação de ferramentas proteômica e metalproteômicas na caracterização de biomarcadores plasmáticos e hepáticos de ratos submetidos ao diabetes tipo 1**. Tese de doutorado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2016.

BRESSLER, R.; JOHNSON, D.G. Pharmacological regulation of blood glucose levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Arch. Intern. Med.** v.157. p.836-848,1997.

CAMAFORTE, N.A. **Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Bauhinia holophylla*(steud.) em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** Dissertação de mestrado Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2013.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.46.nº4,p.419-425, 2002.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios. **Tecmedd**, p.14-20, 2004.

CHANDRASEKARAN, S.;NISHANTHI, R.; PUGALENDI, P. Ameliorating effect of berbamine on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in high-fat diet and streptozotocin induced type 2 diabetic rats. **Biomed. Pharmacother.** v.103, p. 539-545, 2018.

CIARDULLO, A.V. et al. Audit of shared-care program for persons with diabetes: baseline and 3 annual follow-ups. **Acta. Diabetol.** v.41.n1, p.9-13, 2004.

COLEMAN, S.K. *et al.* Myostatin inhibition therapy for insulin-deficient type 1 diabetes. **Sci Rep.** p.1-9, 2016

DA SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Quim. Nova.** v.25.nº3, p.449-454, 2002.

DA SILVA, M.A.B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Rev. bras. farmacogn.*v.20.nº4.p.549-562, 2010.

DA SILVA, M. et al. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. **Diabetologia.** v.43.p.1528-1533, 2000

DE ANGELIS *et al.* Efeitos Fisiológicos do Treinamento Físico em Pacientes Portadores de Diabetes Tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v.50, n.6, p.1005-1013, 2006.

DIAS, S. L.; Maciel, T. R. C.; Sablich, G. M. Diabetes tipo 2 na infância: revisão de literatura. **ConScientiae Saúde.** n. 6, v.1, p. 71-80, 2007.

DONGA, E. et al. Insulin resistance in patients with type 1 diabetes assessed by glucose clamp studies: systematic review and meta-analysis. **Eur.J. Endocrinol.** v.173, p. 101-109, 2015.

ELBERRY, A. A. et al. Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. **Int. J. Diabetes Mellit.** v.3, p. 37-44, 2015.

ELO-MANGA, S. S. et al. Chemical constituents of the leaves of *Campylospermum elongatum*. **Z. Naturforsch.** p.1-5, 2016.

ERDEMGIL, F. Z. et al. Thalictricoside, a new phenolic compound from *Thalictrum orientale*. **Z. Naturforsch.** v.58.p. 632-636, 2003.

- FARIAS, P. A. M; et al. Antibiotic-modifying activity of riachin, a non-cyanogenic cyanoglycoside extracted from *Bauhinia pentandra*. **Drug Des Devel Ther.** v.2015, n.9, p. 3067-3072, 2015.
- FISHER, K.; VUPPALANCHI, R.; SAXENA, R. Drug-induced liver injury. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 139, n. 7, p. 876-887, 2015.
- FORBES, J.M.; COOPER, M.E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev.** v.93, p. 137-188, 2013.
- GROSS, J. L.; AZEVEDO, M. J.; SILVEIRO, S. P. Diabetic Nephropathy: diagnosis, Prevention, and Treatment. **Diabetes Care.** v.28, n. 1, p. 164-176, 2005.
- GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do controle Glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v.46, n.1, p. 16-26, 2002.
- HAN,Q. et al. Constituents from the roots of *Semiaquilegia adoxoides*. **Fitoterapia.**n.72.p.86-88, 2001.
- HILLSON, R. Muscles in diabetes. **Practical Diabetes.**v.34,n. 2, p.42-43, 2017.
- JACOBSON, A. M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin dependente diabetes mellitus. **N. Engl. J. Med.** v.334, n.19, p. 1249-1253, 1996.
- JAHN, A. L.; GUNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment?.**Reprod Toxicol.** v.11, n. 1-3, p. 173-178, 1997.
- KALEGARI, M. **Abordagem fitoquímica, avaliação farmacológica antimicrobiana e toxicológica de *Rourea induta* Planch.** Tese de doutorado Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- KASUGA, M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. **J. Clin. Invest.** v.116. p.1756-1760, 2006.
- KUMAR. R, et al. Type 2 antidiabetic activity of bergenin from the roots of *Caesalpinia digyna* Rottler. **Fitoterapia.**v.83, p. 395–401, 2012.
- LERCO, M. M. et al. Caracterização de um modelo experimental de diabetes mellitus induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.** v.18, n.2, p. 132-142, 2003.
- LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; De KIMPE, N. Natural medicines used in the traditional chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J. Ethnopharmacol.** v. 92, p. 1-21, 2004.
- LIU, R.; PAN, X.; WHITINGTON, P.F. Increased hepatic expression is a major determinant of serum alanine aminotransferase elevation in mice with nonalcoholic steatohepatitis. **Liver Int.**, v. 29, n. 3, p. 337-343, 2009.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Review. Phytomedicine.**v.2, p.137-189, 1995.

MUJICA, F. G. et al. Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O- α -(2''-galloyl)rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves. **Phytother. Res.** v.19, p. 624-627, 2005.

MUTHEE, J.K. et al. Ethnobotanical study of anthelmintic and other medicinal plants traditionally used in Loitokitok district of Kenya. **J. Ethnopharmacol.** v.135,p.15-21, 2011.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** n.41, v.2, p. 121-142, 2005.

NORTON, G.J. et al. Neurobiology of food intake in health and disease. **Nat. Rev. Neurosci.**v.15, p. 367-378, 2014.

ÖZTÜRK, Y.; ALTAN, V.M.; YILDIZOGLU-ARI, N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. **Pharmacol. Rev.**, v. 48, p. 69-104, 1996.

PALMA, H. E.; et al. Oxidative stress parameters in blood, liver, and kidney of diabetic rats treated with curcumin and/or insulin. **Mol. Cell. Biochem.** v. 386, p. 199-210, 2014.

PATEL, D.; KUMAR, R.; LALOO, D.; Hemalatha, S. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian. Pac. J. Trop. Dis.**p.239-250, 2012.

REDDY, K. P.; et al. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.19, p. 4463-4466, 2009.

RERUP, C.C. Drugs producing diabetes through damage of de insulin secreting cells. **Pharmacol.** v.22.n°4.p.485-518,1970.

RIBEIRO, D. L.; et al. Phytochemical study and evaluation of cytotoxicity, mutagenicity, cell cycle kinetic and gene expression of *Bauhinia holophylla* (Bong.) Steud. In HepG2 cells in vitro. **Cytotechnology.** v.70, p. 713-728, 2018.

ROZZA, A.L.; et al. Antiulcerogenic activity and toxicity of *Bauhinia holophylla* hydroalcoholic extract. **Evid Based Complement Alternat Med.**v.2015, p. 1-9, 2015.

SAID, O. et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **J. Ethnopharmacol.** v. 83, p. 251-265, 2002.

SEFI, M. et al. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation and products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. **Food Chem. Toxicol.**n.48, p. 1986-1993, 2010.

SMITH, M. J.; SIMMONS, K. M.; CAMBIER, J. C. B cells in type 1 diabetes mellitus and diabetic kidney disease. **Nrneph.**v. 13, p. 712-720, 2017.

SOUZA, E. et al. Hypoglycemic effect and antioxidante potential of kaempferol-3,7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **J. Nat. Prod.**v.67, p. 829-832, 2004.

SPITERI, M.; ATTARD, E.; SERRACINO-INGLOTT, A; Azzopardi, L.M. Compilation of a herbal medicine formulary for herbal substances in Malta and its usefulness amongst healthcare professionals. **J. Young. Pharm.** v.5, p. 22-25, 2013.

SUTHAGAR, E. et al. Effects of streptozotocin (STZ)-induced diabetes and insulin replacement on rat ventral prostate. **Biomed. Pharmacother.** v. 63,n. 1, p. 43-50, 2008.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiol. Res.** v.50,p.536-546, 2001.

TIH, A. E. Minor Biflavonoids from *Lophira alata* leaves. **J.NAT.PROD.**v.69.n.8, p.1206-1208, 2006.

VAREDA, P.M.P. et al. *Myrcia bella* leaf extract presents hypoglycemic activity via PI3k/Akt insulin signaling pathway. **ECAM.** p. 1-10, 2014.

VASCONCELOS, F. et al. Insulin-like effects of *Bauhinia forficata* aqueous extract upon *Tityus serrulatus* scorpion envenoming. **J.Ethnopharmacol**, v. 95, p. 385-392, 2004.

VOLPATO, G. T. et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do Diabetes mellitus. **Rev. Bras. Pl. Med.** v. 4, p.35-45, 2002.

World Health Organization. Global Report on Diabetes. world Heal Organ **[Internet]**. 2016;1–88. Available from:

http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf

WU, J.; YAN, L.J. Streptozotocin-induced type I diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes. Metab. Syndr. Obes.**v.8. p.181-188, 2015.

YAN, F. et al. Mulberry anthocyanin extract regulates glucose metabolism by promotion of glycogen synthesis and reduction of gluconeogenesis in human HepG cells. **Food Funct.** p. 1-9, 2015.

YAO, H.; et al. Herbal medicines and nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol.**, n. 22. V. 3, p. 6890–6905, 2016.

ZHANG, J. et al. Quality of herbal medicines: Challenges and solutions. **Complement. Ther. Med.**v.20.p.100-106, 2012.