



Instituto de
Biociências

unesp

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



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO DE *Myrcia bella* EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

PRISCILLA MARIA PONCE VAREDA

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, Biologia de Processos e Sistemas.

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2013



Instituto de
Biociências

unesp

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HIPOGLICEMIANTE DO
EXTRATO DE *Myrcia bella* EM CAMUNDONGOS
DIABÉTICOS INDUZIDOS POR ESTREPTOZOTOCINA

PRISCILLA MARIA PONCE VAREDA

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO

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, Biologia de Processos e Sistemas.

Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Vareda, Priscilla Maria Ponce.

Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia bella* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina / Priscilla Maria Ponce Vareda - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Roberto Bosqueiro

Capes: 20702000

1. Diabetes. 2. Plantas medicinais. 3. Mirtacea. 4. Agentes hipoglicêmicos.
5. Camundongo como animal de laboratório.

Palavras-chave: : *Diabetes mellitus*; *Myrcia bella*; Plantas Medicinais;
Sinalização Intracelular.

*Auxílio Financeiro: **FAPESP**
(Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São
Paulo)*



Dedico esse trabalho a Deus, que me capacitou para a realização do mesmo, e aos meus pais, José Carlos e Angela, pelo amor, dedicação, paciência e apoio.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que me capacitou, me deu sabedoria e paciência para a realização de mais uma etapa importante em minha vida.

Agradeço em especial ao meu orientador José Roberto Bosqueiro que me proporcionou a oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório sob a sua orientação. Agradeço por todo conhecimento adquirido, pela dedicação e paciência, pelos conselhos e broncas dados e pelos momentos de risadas. Agradeço também à professora Dr. Anne Dokkadal, pelo fornecimento dos extratos e pelas dúvidas esclarecidas.

Agradeço à minha família que esteve o tempo todo ao meu lado, nos momentos de dificuldades, alegrias e conquistas. Aos meus pais, José Carlos e Angela por toda a dedicação e compreensão nos momentos difíceis e de fraquezas, pelo incentivo, pelo amor incondicional, pelo carinho e por vibrarem junto comigo frente às minhas realizações. Vocês são a minha base e a minha vida.

Agradeço aos meus amigos integrantes e ex-integrantes do laboratório de Química de Produtos Naturais, Catarine Nogueira, Laís Pieroni e Luiz Leonardo Saldanha, pelos momentos de companheirismo e participação nos congressos.

Agradeço aos meus amigos integrantes e ex- integrantes do laboratório de Fisiologia de Pâncreas Endócrino, Jean Janini, Levy Malmonge, Natalia Violato, Nathalia Camaforte, Poliana Teixeira e Stéphanie Dalmassa, por toda ajuda nos experimentos e pelo companheirismo no ambiente de trabalho. Nati agradeço pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas juntas, pelos momentos de pausa para o café, pelas viagens para Botucatu e principalmente pela alegria contagiante que você transmite todos os dias. Você foi essencial nessa caminhada! Nath agradeço pela amizade, todos os experimentos realizados juntas, os momentos de dúvidas compartilhados e pelo companheirismo nos congressos que participamos. Poli, agradeço pela amizade e pela ajuda prestada em todos os momentos que precisei. Agradeço a todos os “lafipianos” por ajudarem esse sonho a se tornar realidade.

Agradeço a todos os meus amigos que acompanharam mais essa fase da minha vida e que tornaram esse momento mais feliz, em especial, à Gabriella Palmeira e Helga Nunes que acompanharam mais de perto a construção desse sonho.

Agradeço aos funcionários da Unesp Bauru, principalmente o nosso bioterista, Thiago Tozi, que ajudou a minimizar os trabalhos com os animais e à limpeza do Biotério.

Agradeço os funcionários da Seção de Pós-graduação por toda ajuda e informações prestadas, principalmente à

Luciana, por toda paciência e ajuda nos telefonemas quase diários.

Agradeço à FAPESP pelo seu apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!

“Tudo posso Naquele que me Fortalece”

Filípenses 4:13

Lista de Abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| ADA | Associação Americana de Diabetes |
| AKT | Serina treonina quinase |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| CTL EXT | Animais normais tratados com extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> |
| CTL SAL | Animais normais tratados com veículo salina |
| DM | <i>Diabetes mellitus</i> |
| DM1 | <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 |
| DM2 | <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| GAD65 | Descarboxilase do ácido glutâmico |
| GLUT 2 | Transportador de glicose do tipo 2 |
| GLUT 4 | Transportador de glicose do tipo 4 |
| GSK-3 | Glicogênio sintase quinase 3 |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidade |
| IAA | Anticorpos anti-insulina |
| ICA | Anticorpos anti-ilhota pancreática |
| IR | Receptor de Insulina |
| IRS | Substrato do receptor de insulina |
| IRS 1 | Substrato do receptor de insulina tipo 1 |
| K ⁺ | Potássio |

| | |
|---------------------------------|--|
| KOH | Hidróxido de Potássio |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NAD ⁺ | Nicotina adenina dinucleotídeo |
| Na ₂ SO ₄ | Sulfato de Sódio |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PI3-K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| PEPCK | Fosfoenolpiruvato carboxiquinase |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPM | Rotação por minuto |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| STZ | Estreptozotocina |
| STZ EXT | Animais diabéticos tratados com extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> |
| STZ SAL | Animais diabéticos tratados com veículo salina |
| VLDL | Lipoproteínas de muito baixa densidade |

Lista de Figuras

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 – | Classificação etiológica do <i>Diabetes mellitus</i> | 24 |
| Figura 2- | Resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina após interação com seu receptor..... | 26 |
| Figura 3 – | Regulação do metabolismo de glicose pelo fígado..... | 28 |
| Figura 4 – | Efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental..... | 32 |
| Figura 5 – | Efeito da administração aguda de salina (CTL SAL) e do extrato bruto de <i>M. bella</i> (2000mg/Kg - CTL EXT) sobre o peso corpóreo de camundongos normais..... | 46 |
| Figura 6- | Glicemia de jejum (mg/dL) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de <i>M. Bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 48 |
| Figura 7 - | Ingestão hídrica (mL/animal) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. Bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 49 |

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 8 - | Ingestão alimentar (g ração/100g peso corpóreo) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. Bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 50 |
| Figura 9 - | Peso corpóreo de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. Bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 51 |
| Figura 10 - | Glicogênio hepático (mg%) de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 53 |
| Figura 11 - | Glicogênio muscular (mg%) de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 54 |
| Figura 12- | Expressão proteica de IRS-1 de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 55 |
| Figura 13 - | Expressão proteica de PI3-K de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 56 |
| Figura 14 - | Expressão proteica de AKT de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de <i>M. bella</i> durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT)..... | 57 |

Listas de Tabelas

- Tabela 1– Efeito da administração aguda de salina (1mL/Kg) ou de extrato bruto de *M. bella* (2000mg/Kg) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos.....47
- Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de animais controle e diabéticos tratados com salina ou extrato bruto de *M. bella* na dose de 600mg/Kg durante 21 dias.....52

Resumo

O *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado como uma desordem metabólica, resultante de defeitos da ação ou secreção na insulina, ou ambos, defeitos estes que levam a alterações no metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídios. Tais alterações causam sérias consequências aos pacientes diabéticos, levando a graves complicações como perda de peso, aumento nos níveis lipídios no sangue, aumento da incidência de aterosclerose e doenças arteriais periféricas, danos à visão e aos rins, e em casos mais graves, óbito. A incidência de pessoas diabéticas em todo mundo vem aumentando de modo alarmante ao longo dos anos, e pesquisas recentes têm mostrado que o número de diabéticos na população tende a aumentar cada vez mais nas próximas décadas. Esse preocupante aumento na incidência do diabetes deve-se aos atuais estilos de vida das pessoas, que incluem hábitos não saudáveis, sedentarismo e obesidade. Os tratamentos atuais para o DM incluem a insulinoterapia, assim como o uso de hipoglicemiantes orais. No entanto, são relatados pelos pacientes, inúmeros efeitos colaterais e desconfortos causados pelos mesmos. Partindo dessas informações, a pesquisa por novos agentes que possam agir na melhora do diabetes tornou-se alvo de estudos. Nesse contexto, o estudo de plantas medicinais que possuam efeitos hipoglicemiantes e que atuem na melhora do quadro diabético vem despertado o interesse dos pesquisadores. A família Myrtaceae é uma família botânica com muitos representantes na flora brasileira, e, desse modo, gera muito interesse nas pesquisas a respeito de suas espécies. O gênero *Myrcia* ainda é pouco explorado pelos pesquisadores, e há um número reduzido de estudos acerca da atividade hipoglicemiante de espécies desse gênero. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a possível atividade hipoglicemiante do extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* Cambess., uma planta proveniente do cerrado brasileiro, em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina. Camundongos diabéticos (STZ SAL e STZ EXT) e controles (CTL SAL e CTL EXT) foram tratados durante 21 dias com salina e extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg. Foram avaliados parâmetros como ingestão hídrica, ingestão alimentar, peso corpóreo, colesterol total, triglicérides, glicemia de jejum e proteínas plasmáticas totais. Os níveis de glicogênio hepático e muscular foram avaliados, assim como a expressão de algumas proteínas da via de sinalização insulínica, quais sejam IRS-1, PI3-K e AKT. Foi realizado também o teste de toxicidade aguda em camundongos normais para

observações comportamentais e pesagem de órgãos dos animais tratados com uma dose de 2000mg/Kg do extrato. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test Tukey* com nível de significância de $p < 0,05$. Para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado com nível de significância de $p < 0,05$. O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose e período de tempo citados anteriormente, promoveu melhora no quadro diabético dos animais através da diminuição dos níveis séricos de glicose, triglicérides e colesterol, assim como diminuição nos sintomas de polidipsia e polifagia. O tratamento também promoveu aumento dos níveis de glicogênio hepático em animais diabéticos e da expressão das proteínas IRS-1, PI3-K e AKT, indicando um possível efeito glicorregulatório do extrato. O teste de toxicidade realizado em camundongos normais, não apontou nenhum comportamento atípico avaliado através do “screening” hipocrático. No entanto, foi observado aumento no tamanho dos rins de animais que receberam o extrato, sendo necessário, portanto, mais estudos a cerca da toxicidade do mesmo. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que o tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* apresenta atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica, agindo na diminuição da glicemia, em parte através dos processos de captação e armazenamento de glicose pelo fígado.

Palavras chave: *Diabetes mellitus*, *Myrcia bella*, plantas medicinais, sinalização intracelular.

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is characterized as a metabolic disorder resulting in defects of action and/or insulin secretion, resulting in disturbances in the metabolism of proteins, carbohydrates and lipids which can cause serious consequences to diabetic patients, resulting in complications such as weight loss, increased blood lipid levels, increased incidence of atherosclerosis and peripheral artery diseases, vision and kidneys injury, and in severe cases, death. The incidence of diabetics worldwide is increasing alarming over the years, and recent research has shown that the number of diabetics in the population will tend to a significantly increasing in coming decades. This alarming increase in the incidence of diabetes is due to the current lifestyles including unhealthy habits, sedentary lifestyle and obesity. Current treatments for diabetes include the use of exogenous insulin, as well of oral hypoglycemic agents. However, patients report numerous side effects and discomfort caused by them. Based on this information, the search for new agents that can act to improve diabetes has become the focus of several studies. In this context, the study of medicinal plants that has hypoglycemic effects and that acts in improving the diabetic state coming arousing interest of researchers. Myrtaceae is a botanical family that has many representatives in the Brazilian flora, and thus generates much interest in research on their species. The genus *Myrcia* is still not well explored by the researchers, and there are a few studies about the hypoglycemic activity of species in that genus. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible hypoglycemic activity of the crude extract of the leaves of *Myrcia bella* Cambess, a plant from the Brazilian cerrado, in streptozotocin-induced diabetic mice. Diabetic (STZ SAL and STZ EXT) and control mice (CTL SAL and CTL EXT) were treated during 21 days with saline and the crude extract of leaves of *Myrcia bella* at a dose of 600mg/Kg. It were assessed physiological parameters like water and food intake, body weight, and biochemical parameters like total cholesterol, triglycerides, blood fasting glucose and total proteins. The levels of hepatic and muscular glycogen were evaluated as well as the expression of some protein of signaling pathway insulin, namely IRS-1, PI3-K and AKT. It was realized the acute toxicity test in normal mice to behavior observations and weighing of organs from animals treated with a dose of 2000mg/Kg of the extract. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean and ANOVA followed by Tukey post test was used for multiple comparison of parametric data with significance

level adopted of $p < 0.05$. For comparison between two groups unpaired Student t test was used with significance level adopted of $p < 0.05$. The treatment with the crude extract of *Myrcia bella* at the dose and time period mentioned above, promoted improvement in the diabetic state by lowering of serum glucose, triglycerides and total cholesterol as well as decrease in symptoms of polydipsia and polyphagia. The treatment promoted increase in liver glycogen levels of diabetic animals, and expression of IRS-1, PI3-K and AKT, indicating a possible glucoregulatory effect of the extract. The toxicity test conducted in normal mice did not reveal any unusual behavior evaluated through hippocrat screening. However, we observed an increase in the size of kidneys from animals which received the extract, requiring therefore more studies about the toxicity. From the present results, we can conclude that the treatment with the crude extract of *Myrcia bella* has hypoglycemic and hypolipidemic activity, acting on blood glucose lowering through, at least in part, the processes of uptake and storage of glucose in liver.

Keywords: *Diabetes mellitus*, intracellular signaling, medicinal plants, *Myrcia bella*.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1.Introdução..... | 21 |
| 1 .1 <i>Diabetes mellitus</i> | 22 |
| 1.2 - Etiologia do <i>Diabetes mellitus</i> | 22 |
| 1.3 Insulina..... | 24 |
| 1.4 – Sinalização insulínica e suas ações metabólicas..... | 25 |
| 1.5 – Tratamentos atuais para o <i>Diabetes mellitus</i> | 28 |
| 1.6 - Modelos experimentais de <i>Diabetes mellitus</i> | 30 |
| 1.7 - Família Myrtaceae | 32 |
| 1.8 - Genêro <i>Myrcia</i> | 33 |
| 2.Objetivos..... | 36 |
| 2.1 - Objetivo Geral | 37 |
| 2.2 – Objetivos Específicos | 37 |
| 3.Materiais e Métodos | 38 |
| 3.1 - Obtenção do extrato e análises farmacognósticas e químicas | 39 |
| 3.2- Animais..... | 39 |
| 3.3 - Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”..... | 39 |
| 3.4- Indução do diabetes experimental | 40 |
| 3.5 – Divisão dos Grupos..... | 40 |
| 3.6 - Tratamento com salina e com extrato bruto de <i>Myrcia bella</i> | 40 |
| 3.7 - Avaliação da glicemia de jejum..... | 41 |
| 3.8 - Avaliação da Ingestão Hídrica e Alimentar..... | 41 |
| 3. 9 – Avaliação do Peso Corpóreo..... | 41 |
| 3.10 – Avaliação dos Parâmetros bioquímicos | 41 |
| 3.11 – Avaliação do Glicogênio hepático e muscular | 41 |

| | |
|--|----|
| 3.12 - Extração proteica e Western blott..... | 42 |
| 4. Análises Estatísticas | 43 |
| 5 .Resultados..... | 45 |
| 5.1 – Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático” | 46 |
| 5.2 – Avaliação da Glicemia de Jejum..... | 47 |
| 5.3 – Avaliação da Ingestão Hídrica e Alimentar | 48 |
| 5.4 – Avaliação do Peso Corpóreo..... | 50 |
| 5.5 – Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos | 51 |
| 5.6 – Avaliação do Glicogênio Hepático e Muscular | 52 |
| 5.7 – Análise da Expressão proteica por Western blott | 54 |
| 6.Discussão | 58 |
| 7.Conclusão | 67 |
| 8. Referências | 69 |
| 9.Anexos | 79 |
| 9.1 - Anexo 1 | 80 |
| 9.2 – Anexo 2..... | 81 |

1. Introdução

1.1 Diabetes mellitus

O termo *Diabetes mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica que acarreta alterações do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas resultante de defeitos na ação ou secreção da insulina, ou ambos. Os sintomas da hiperglicemia acentuada no paciente diabético incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o mundo encontra-se hoje no centro de uma epidemia diabética. No ano de 1985 estimava-se que havia 30 milhões de pessoas diabéticas em todo o mundo, número este que aumentou drasticamente em um período de dez anos, chegando a 135 milhões de pessoas diabéticas. Estimativas apontam que no ano de 2030, este número deve alcançar 366 milhões de pessoas com esta síndrome, dos quais 90% apresentarão diabetes tipo 2 (DM2). Hoje, no Brasil, estima-se que haja cerca de 12 milhões de pessoas diabéticas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2012). O aumento da prevalência de diabetes, principalmente em países desenvolvidos, deve-se, sobretudo, ao crescimento e envelhecimento populacional, maior urbanização, aumento dos hábitos não saudáveis, assim como aumento da obesidade e do sedentarismo (FERREIRA; FERREIRA, 2009).

O diabetes, se não tratado, pode levar a múltiplas complicações que incluem retinopatia com possíveis danos à visão, nefropatia podendo levar à insuficiência renal, neuropatia periférica com risco de ulcerações no pé e amputações. Pacientes com diabetes têm risco aumentado de incidência de aterosclerose e doença arterial periférica, uma vez que o metabolismo lipídico está alterado (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

1.2 - Etiologia do *Diabetes mellitus*

A classificação proposta pela OMS e pela ADA inclui quatro classes clínicas de DM: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009) (Figura 1).

O DM1 ocorre devido à deficiência absoluta na produção de insulina, em geral ocasionada por processo autoimune, que leva à destruição das células beta das ilhotas de Langerhans, as células produtoras de insulina. Pacientes com este tipo de diabetes

dependem de tratamento com insulina exógena para a sustentação da vida. A maioria destes indivíduos desenvolvem anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA), anticorpos anti-insulina (IAA), anticorpo contra a isoforma de 65 KDa da descarboxilase do ácido glutâmico (GAD65) e antígenos associados ao insulinoma 1A-2A. Alguns indivíduos diabéticos com características do DM1 não possuem evidências de autoimunidade e são classificados como do tipo 1 idiopático. A maior incidência do DM1 ocorre na infância e na adolescência (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011).

O DM2 deve-se à deficiência relativa na produção pancreática de insulina associada à redução da sensibilidade dos tecidos ao hormônio, também conhecida como resistência periférica à insulina. A resistência insulínica ocorre quando uma concentração normal desse hormônio produz uma resposta biológica inadequada nos tecidos periféricos, como o tecido adiposo e muscular. Essa resistência periférica à insulina ocorre por vários fatores como por defeito na ação da insulina em função do número menor de receptores ou afinidade menor destes pela insulina, redução na quantidade de proteínas transportadoras de glicose ou na translocação destas do citoplasma para a membrana, sendo esta última considerada a mais importante. A transição da resistência insulínica para o DM é determinada principalmente pela incapacidade do pâncreas em aumentar a secreção da insulina adequadamente em resposta à hiperglicemia (MCLELLAN et al., 2007).

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

O diabetes gestacional é definido como uma tolerância diminuída à glicose, de graus variados de intensidade, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (WHO, 1999). Os fatores de risco associados ao diabetes gestacional são semelhantes aos descritos para o diabetes tipo 2, incluindo outros fatores como idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio (excesso de líquido amniótico), hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez e antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal (GROSS et al., 2002).

-
- I. Diabetes tipo 1**
 - destruição das células beta, usualmente levando à deficiência completa de insulina
 - A. auto-imune
 - B. idiopático
 - II. Diabetes tipo 2**
 - graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina
 - III. Outros tipos específicos**
 - A. Defeitos genéticos da função da célula β
 - B. Defeitos genéticos da ação da insulina
 - C. Doenças do pâncreas exócrino
 - D. Endocrinopatias
 - E. Indução por drogas ou produtos químicos
 - F. Infecções
 - G. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado
 - IV. Diabetes Gestacional**
-

Figura1 – Classificação etiológica do *Diabetes mellitus* (GROSS et al., 2002).

1.3 - Insulina

A insulina, hormônio relacionado diretamente ao diabetes, é o principal hormônio anabólico que regula o metabolismo intermediário. Além de participar de processos de crescimento e diferenciação celular, regula o metabolismo de proteínas, lipídios e carboidratos. Esse hormônio é secretado pelas células beta das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos que ocorre após as refeições (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A insulina humana, como muitos hormônios proteicos, é sintetizada como uma proteína precursora maior, seguida de uma clivagem proteolítica, para gerar o hormônio ativo (WANG; TSOU, 1991). Desse modo, a insulina é produzida sob a forma de um único polipeptídeo, a pré-pró-insulina, que se constitui em uma cadeia de 110 aminoácidos. Os vinte e quatro primeiros aminoácidos desta cadeia formam o peptídeo sinal ou sequência pré da proteína e tem a função de facilitar a entrada da mesma para o retículo endoplasmático. Durante esse processo, o peptídeo sinal é separado da proteína, resultando na formação da pró-insulina. Essa molécula resultante, na qual as cadeias A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) estão ligadas pelo peptídeo C (35 aminoácidos), é a precursora da insulina. Ela adquire sua conformação final pela união das cadeias A e

B através de duas pontes dissulfeto, sendo então transportada para o aparelho de Golgi onde vai ser empacotada em grânulos de estoque. Durante a formação e maturação dos grânulos secretórios, a pró-insulina é clivada por enzimas proteolíticas do tipo da tripsina, resultando na liberação do peptídeo C. Desse modo, as duas cadeias A e B estão ligadas entre si pelas pontes dissulfeto, ainda com outra ponte interna na cadeia A, formando a molécula de insulina (STEINER et al., 1985).

1.4 – Sinalização insulínica e suas ações metabólicas

A insulina exerce importantes efeitos celulares metabólicos e mitogênicos mediados pelo seu receptor, que está presente em praticamente todos os tecidos de vertebrados (KAHN, 1985). O aumento da captação de glicose, mediado pela insulina, ocorre 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. Além disso, a insulina promove aumento da fosforilação intracelular da glicose, aumentando a produção de glicose-6-fosfato. Esta é então convertida em glicogênio pelo processo de glicogênese e, então, estocado no fígado e em músculo. A insulina inibe ainda a neoglicogênese hepática, processo este que aumenta a formação de glicose e sua posterior liberação na corrente sanguínea (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Todos esses mecanismos são importantes para a retirada de glicose da corrente sanguínea e entrada da mesma nas células, para posterior utilização como forma de energia.

A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana (IR), uma proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β , que atua como uma enzima alostérica na qual a subunidade α inibe a atividade tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando à alteração conformacional da molécula e autofosforilação, o que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002) (Figura 2). Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos proteicos em tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina denominada IRS (WHITE, 1998). Uma das principais moléculas ativadas pelas

proteínas IRS é a PI3K, importante na regulação da mitogênese, metabolismo de glicose, diferenciação celular e para o processo de translocação do GLUT4. Outro grupo de proteínas, pertencentes à família de proteínas AKT (AKT1, AKT2 e AKT3), também chamadas de proteínas quinase B, é composta por proteínas quinase de serina/tirosina que desempenham importante papel na sinalização celular de mamíferos. A fosforilação da AKT, que ocorre pela ação da proteína PI3-K, resulta em várias ações intracelulares da insulina, como, por exemplo, o aumento do transporte de glicose através da estimulação de vesículas contendo GLUT4 do citoplasma para a membrana celular em músculo e tecido adiposo (BRYANT et al., 2002).

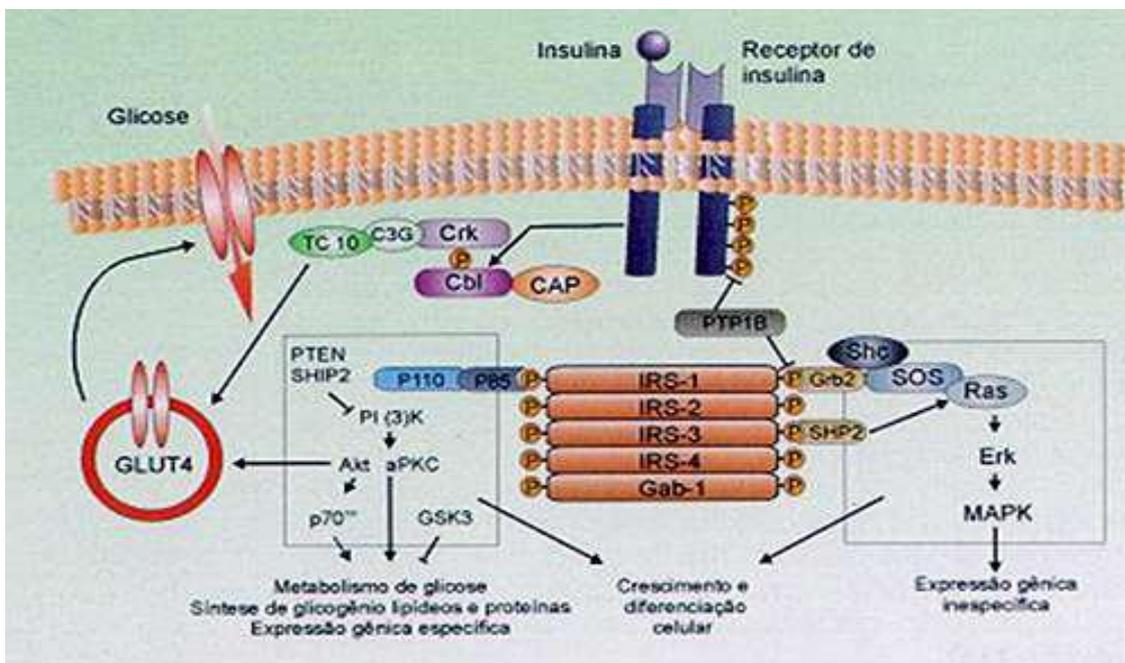


Figura 2- Resposta dos tecidos periféricos à ação da insulina após interação com seu receptor (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

No fígado, a insulina é responsável por promover a oxidação da glicose (glicólise) e o seu armazenamento como glicogênio (glicogênese), além de inibir a neoglicogênese (síntese de glicose a partir de compostos que não são carboidratos, como aminoácidos, lactato e glicerol) e a glicogenólise (quebra de glicogênio realizada por retirada sucessiva de moléculas de glicose), o que irá reduzir a produção hepática de glicose.

Na neoglicogênese, a insulina inibe diretamente a transcrição de genes que codificam a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima chave no controle

desse processo. O hormônio também diminui a taxa de transcrição de genes que codificam as enzimas frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase responsáveis pela formação de glicose-6-fosfato que será posteriormente liberada na corrente sanguínea como glicose, e aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas glicolíticas como a glicoquinase e a piruvato quinase, enzimas responsáveis pela oxidação da glicose para posterior utilização no ciclo de Krebs (PILKS; GRANER, 1992; SURTHERLAND et al., 1996) (Figura 3).

A ação da insulina sobre a glicogenólise é obtida por desfosforilação da enzima glicogênio sintase. Após estímulo com insulina, a AKT fosforila e inativa a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), responsável por fosforilar a glicogênio sintase. Desse modo, ocorre diminuição da taxa de fosforilação desta, aumentando então a sua atividade (CROSS et al., 1995). A insulina também ativa a proteína fosfatase 1, por um processo dependente da PI3-K, que desfosforila a glicogênio sintase diretamente (BRADY et al., 1997).

Na célula muscular e no adipócito, a insulina é importante para promover a captação de glicose, sua utilização como fonte energética, bem como a estocagem do excedente, quer na forma de glicogênio, quer na forma de gordura. A captação de glicose nestes tecidos depende como dito anteriormente, da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana da célula, estimulada pela insulina, através da interação das proteínas descritas anteriormente (BAVILONI et al., 2010).

A insulina estimula, ainda, a lipogênese (síntese de ácidos graxos) no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise (quebra dos triglicerídeos) bem como aumenta a síntese e inibe a degradação proteica nos tecidos (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

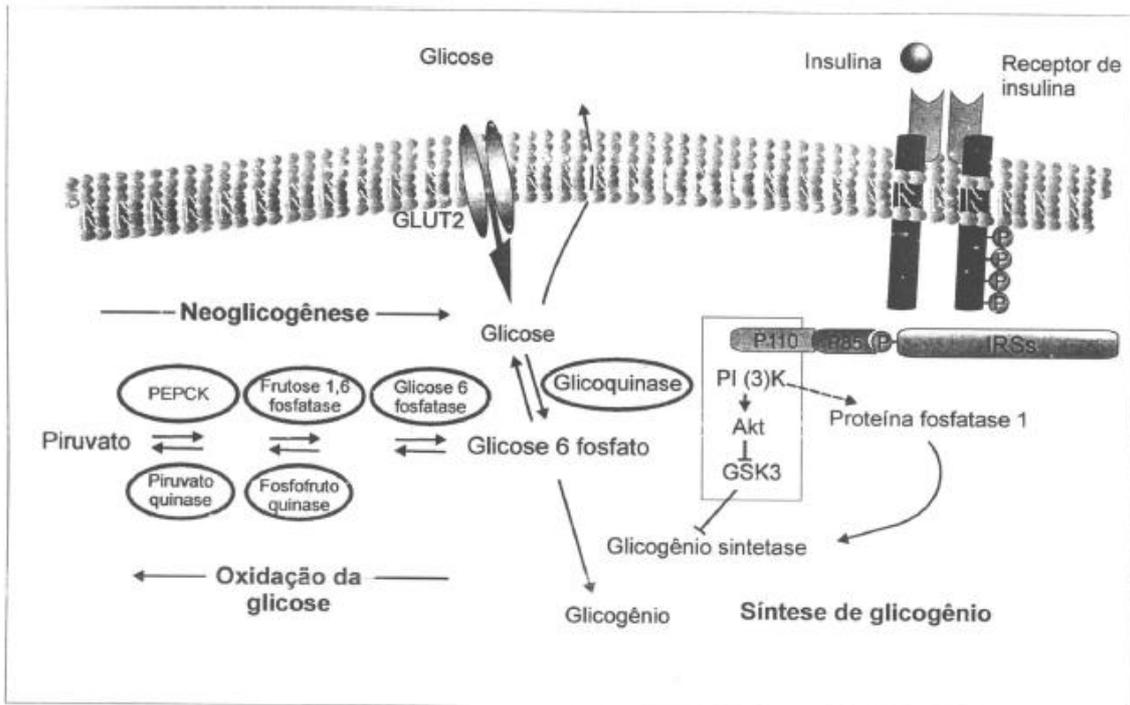


Figura 3 – Regulação do metabolismo de glicose pelo fígado (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

1.5 – Tratamentos atuais para o *Diabetes mellitus*

Os tratamentos atuais para DM incluem a insulino terapia, através do uso da insulina exógena, e a administração de drogas alopáticas como sulfoniluréias (glibenclamida), biguanidas (metformina) e inibidores da alfa-glicosidase (acarbose e miglitol), podendo ou não ser administradas em conjunto (HSU et al., 2009).

Os agentes hipoglicêmicos orais exercem seus efeitos na redução da glicemia através de uma variedade de mecanismos que incluem a redução na produção de glicose hepática (metformina), aumento na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas (secretagogos de insulina como as sulfoniluréias), melhora da sensibilidade à insulina (metformina e tiazolidinediona) e inibição da digestão e absorção da glicose intestinal (inibidores de alfa-glicosidase como acarbose e miglitol) (CHENG; FUNTUS, 2005).

A metformina é um derivado da guanidina, um composto hipoglicemiante proveniente da planta *Galega officinalis*. Essa erva medicinal, também conhecida como Lilac francês, foi usada durante séculos na Europa como tratamento para o diabetes desde a época medieval (BAILEY; DAY, 1989) A metformina apresenta efeito

sensibilizador periférico para a insulina. No fígado, este medicamento promove a inibição da neoglicogênese e glicogenólise, e estimula a glicogênese. Em outros tecidos periféricos, principalmente na musculatura esquelética, este medicamento é responsável pelo aumento da captação de glicose provocando rápida redução da glicemia plasmática. No adipócito, a metformina inibe a lipólise e a disponibilidade de ácidos graxos livres. Tem sido descrito que esta droga aumenta o número e melhora a afinidade dos receptores de insulina, tanto no adipócito quanto no tecido muscular. Em nível celular foi demonstrado que a mesma aumenta a atividade tirosina quinase do receptor de insulina, estimulando a translocação do transportador GLUT4 e a atividade da enzima glicogênio sintase (SANTOS et al., 1995). Diferentemente dos secretagogos, a metformina não aumenta os níveis plasmáticos de insulina (BAILEY; TURNER, 1996).

As sulfoniluréias, como a clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida, e a glimeperida, são drogas com ação hipoglicemiante que atuam no pâncreas aumentando a secreção de insulina. Elas se ligam aos seus receptores na superfície das células beta pancreáticas, que são intimamente ligadas com subunidades dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, induzindo o fechamento desses canais com consequente inibição da saída dos íons potássio, desencadeando o processo de despolarização da membrana e secreção de insulina. Entretanto, esses fármacos não afetam a sensibilidade à insulina e podem causar efeitos indesejáveis como hipoglicemia e ganho de peso, e, a longo prazo, danos renais e hepáticos (CHENG; FUNTUS, 2005).

As tiazolodinedionas, como a rosiglitazona e a pioglitazona, são fármacos sensibilizadores da ação da insulina, uma vez que aumentam a expressão de genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídeos (GOMES, 2006). Estudos em modelos animais têm demonstrado que as tiazolodinedionas melhoram e preservam a função das células beta pancreáticas (CHENG; FUNTUS, 2005). Por outro lado, seu uso provoca efeitos adversos tais como ganho de peso, edema, hepatotoxicidade e insuficiência cardíaca congestiva (CHENG; FUNTUS, 2005; GOMES, 2006).

Os inibidores da alfa-glicosidase, como a acarbose e o miglitol agem como antagonistas enzimáticos da alfa-amilase e diminuem a absorção intestinal da glicose (JENMEY et al., 1993; SEGAL, 1997). Estes medicamentos não interferem na secreção de insulina, e diminuem a glicemia de jejum e a hiperglicemia pós-prandial. No entanto,

efeitos indesejáveis como diarreias e dores abdominais também ocorrem com o seu uso (ARAUJO; BRITTO; PORTO DA CRUZ, 2000).

1.6 - Modelos experimentais de *Diabetes mellitus*

A indução do diabetes experimental em modelos animais é realizada através do uso de substâncias que destroem seletivamente as células beta do pâncreas, produtoras de insulina. As substâncias mais utilizadas para indução do diabetes em roedores são a aloxana e a estreptozotocina (SZKUDELSKI, 2001). Ambas são citotóxicas, análogos da glicose e, embora as suas citotoxicidades ocorram através de diferentes mecanismos, o modo de captação de ambas as substâncias pelas células beta do pâncreas é o mesmo, ocorrendo através do transportador de glicose do tipo GLUT 2 (LENZEN, 2008).

A estreptozotocina (STZ) é um glicosídeo nitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*. Este xenobiótico tem sido usado para induzir tanto o DM1 quanto o DM2, dependendo da concentração, dose e via de administração (NEGRI, 2005; SZKUDELSKI, 2001). Quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência de insulina com quadro de hiperglicemia. Na dose de 160 a 250 mg/Kg, apresenta efeito citotóxico direto nas células beta de camundongos, causando danos no ácido desoxirribonucléico (DNA), como fragmentação e alquilação do mesmo, exaurindo a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo, dando início a morte das células beta, através da depleção de energia. Duas horas após a injeção de STZ já se observa hiperglicemia devido à diminuição nos níveis de insulina no sangue. Cerca de seis horas depois, com a destruição das células beta e concomitante liberação do conteúdo de insulina presente nas mesmas, ocorre hipoglicemia, com consequente diminuição da glicose sanguínea. Finalmente, dias depois, a hiperglicemia se desenvolve e ocorre diminuição irreversível dos níveis de insulina no sangue (WEST et al., 1996). Estas alterações na glicemia e insulinemia refletem as alterações causadas nas células beta. Em doses sub-diabetogênicas (40mg/kg) a STZ pode produzir insulite pancreática, ocasionando inflamação com morte progressiva das células beta levando ao quadro de diabetes. Tratamentos com pequenas concentrações e em dias consecutivos culminarão com o aparecimento de lesões inflamatórias nas ilhotas através de reação imune mediada pelas células T (LEZEN, 2008).

A aloxana, um derivado de pirimidina, tem sua ação no pâncreas através da rápida captação pelas células beta pancreáticas, o que tem sido proposto como uma das características mais importantes que determinam a diabetogenicidade dessa substância. Outro aspecto importante em relação à diabetogenicidade da aloxana é a formação de espécies reativas de oxigênio, que têm como um de seus alvos o DNA das ilhotas pancreáticas, ocasionando sua fragmentação e quebra. Apesar da característica diabetogênica da aloxana, muitos pesquisadores sugerem que sua seletividade de ação não é muito satisfatória (SZKUDELSKI, 2001). Apesar de ser um bom modelo para a indução do diabetes, há muitos problemas devido à sua instabilidade química, metabolismo rápido e alguns outros fatores, como dieta e idade, que tornam quase impossível estabelecer uma relação clara entre as doses da mesma e sua concentração efetiva no pâncreas (MARLES; FARNSWORTH, 1995).

Ambos os agentes químicos, aloxana e estreptozotocina, induzem uma deficiência da produção de insulina pela morte das células beta. Embora os mecanismos de captação de ambas as substâncias pelas células beta pancreáticas via transportadores de glicose GLUT2 e resultante morte das mesmas por necrose sejam idênticos, a ação tóxica da aloxana é mediada via espécies reativas de oxigênio, e da estreptozotocina via alquilação do DNA das células beta (Figura 4). No entanto, devido à maior estabilidade química da estreptozotocina em relação à aloxana, a primeira tem sido o agente mais usado para reprodução do diabetes em roedores (LENZEN, 2008).

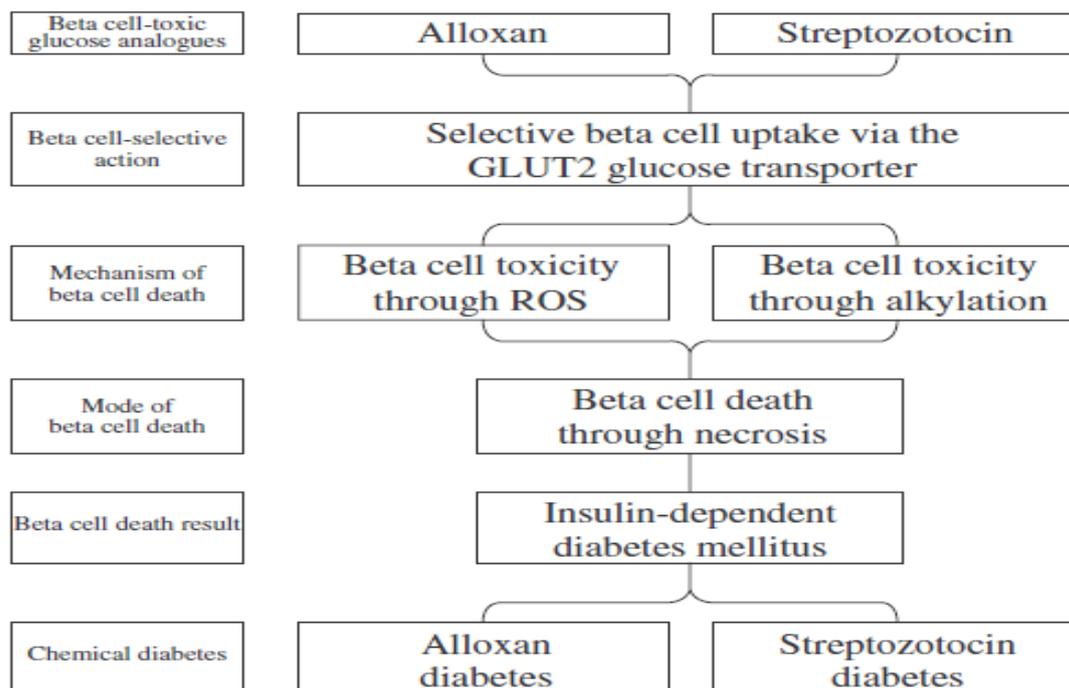


Figura 4 – Efeitos tóxicos da estreptozotocina e da aloxona em células beta pancreáticas em modelo de diabetes experimental (LENZEN, 2008).

1.7 - Família Myrtaceae

Inserida na ordem Myrtales, a família Myrtaceae (do grego *Myrtus* = perfume) é uma família botânica com cerca de 140 gêneros e aproximadamente 5.600 espécies de árvores e arbusto (WILSON et al., 2001) e que possui a América tropical e a Austrália como seus dois principais centros de desenvolvimento, embora ocorra em outras regiões do mundo. É considerada uma das mais importantes famílias em diversidade de espécies nos neotrópicos, compreendendo de 10 a 15% da vegetação ao longo da Mata Atlântica e dos Cerrados brasileiros (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000). Myrtaceae aparece como a terceira família mais representativa dos cerrados brasileiros e pode ser considerada dominante em número de espécies, número de indivíduos e na área basal total em algumas florestas úmidas do leste do Brasil (MORI et al., 1983). O cerrado é considerado uma das mais ricas vegetações do mundo e ocorre principalmente na região centro-norte do Brasil, representando cerca de um terço da biota brasileira, cobrindo mais de 20% do território brasileiro, sendo a segunda em termos de cobertura de área nacional (FELFILI; SILVA-JUNIOR, 1993).

No Brasil ocorrem 25 gêneros e aproximadamente 1.200 espécies de Myrtaceae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997), sendo que todos os representantes nativos pertencem à subfamília Myrtoideae composta por 15 tribos. Destas, a mais rica é Myrteae (WILSON et al., 2005; LUCAS et al., 2007), distribuída em regiões tropicais, subtropicais e marítimas e que compreende todas as mirtáceas americanas. É composta por aproximadamente 49 gêneros e cerca de 2.500 espécies sendo a mais diversificada tribo em relação ao número de gêneros da família (LUCAS et al., 2007) e se divide em três subtribos, Eugeniinae, Myrciinae e Myrtinae (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Dentro da tribo Myrteae, os gêneros mais representativos em espécies são *Eugenia*, com aproximadamente 1.000 espécies, *Myrcia*, com aproximadamente 760 espécies, *Psidium*, com aproximadamente 92 espécies e *Campomanesia*, com aproximadamente 37 espécies.

1.8 - Gênero *Myrcia*

Espécies do gênero *Myrcia* têm sido utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, para o tratamento do *Diabetes mellitus*, para estancar hemorragias e no tratamento de hipertensão e úlceras (RUSSO, 1990).

As plantas, conhecidas como “pedra-hume-caá” ou planta insulina, são utilizadas no tratamento do diabetes segundo o conhecimento empírico indígena e africano, que influenciaram a formação da cultura brasileira. As espécies mais relacionadas ao nome popular de “pedra-hume-caá” são *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia citrifolia*, *Myrcia guianensis*, *Myrcia uniflora*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia salicifolia* e *Myrcia speciosa* (JORGE; AGUIAR; SILVA, 2000; LIMBERGER et al., 2004; MATSUDA et al., 2001, 2002; YOSHIKAWA et al., 1998, 2002). Em relação ao grande número de espécies dentro do gênero, ainda são escassos os trabalhos sobre as mesmas, principalmente em relação a estudos que avaliam suas potenciais propriedades hipoglicemiantes. Os dados apresentados a seguir são alguns dos poucos encontrados na literatura a respeito de espécies do gênero *Myrcia*.

Estudos sobre a atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia uniflora* revelaram que o mesmo, administrado durante três semanas em animais diabéticos induzidos por estreptozotocina, reduziu os níveis de glicemia de jejum, a polifagia e polidipsia, assim como o volume urinário, além de inibir a absorção de glicose intestinal, promovendo melhora no quadro diabético dos animais (PEPATO et al., 2003).

Miura; Mizutani; Ishida (2006) estudaram a possível atividade hipoglicemiante do extrato hidroalcoólico de *Myrcia speciosa*. Os resultados obtidos mostraram que o extrato administrado nas doses de 500 e 1500mg/Kg diminuiu os níveis glicêmicos de camundongos geneticamente modificados para diabetes tipo 2, indicando uma atividade hipoglicemiante do mesmo.

Estudos a respeito da atividade hipoglicemiante de *Myrcia multiflora* já foram demonstrados através do tratamento com extratos brutos, decocções e algumas substâncias isoladas. *Myrcia multiflora* é uma espécie encontrada no Brasil e amplamente utilizada para o tratamento do diabetes nos países da América do Sul. Estudos com esta espécie mostraram uma potente atividade inibitória da enzima aldose redutase em ratos (MATSUDA et al., 2001, 2002; YOSHIKAWA et al., 1998) uma enzima chave na via dos poliois que catalisa a redução de glicose a sorbitol. O sorbitol se difunde através das membranas celulares, e seu acúmulo pode causar complicações crônicas como retinopatia e catarata (MATSUDA et al., 2002). *Myrcia multiflora* demonstrou também inibição da enzima alfa glicosidase, enzima esta responsável pela absorção de glicose no intestino delgado. Os autores sugerem a atividade inibitória de tais enzimas pela presença dos flavonoides isolados do extrato como myrciacitrinas, glicosídeos e myrciafenonas (YOSHIKAWA et al., 1998). Três novos derivados de flavonoides, myrciacitrina III, IV e V e dois previamente conhecidos, myrciacitrina I e II foram isolados das folhas de *Myrcia multiflora*, apontados como os responsáveis pela atividade inibitória das enzimas descritas anteriormente (MATSUDA et al., 2002).

Dentre as várias espécies de *Myrcia* encontradas nos cerrados do estado de São Paulo, *Myrcia bella* Cambess. é caracterizada como um arbusto que floresce de outubro a novembro e frutifica de novembro a dezembro. Trabalhos acerca desta espécie ainda são escassos e não há, até o momento, nenhum estudo que avalie sua potencial atividade hipoglicemiante. Estudos a respeito da química do extrato bruto de *Myrcia bella* estão em andamento. Saldanha et al. estudaram o perfil químico do extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* e tal estudo revelou a presença de ácidos fenólicos e flavonoides glicosilados (ligados a uma molécula de açúcar) derivados de quercetina e miricetinas, além de flavonoides glicosilados acilados (ligados a uma molécula de ácido gálico esterificado na molécula de açúcar) (em fase de elaboração)¹. Uma vez que alguns dos compostos encontrados no extrato bruto hidroalcoólico (etanol 70%) das folhas de *Myrcia bella* estão presentes também das folhas de *Myrcia multiflora*, pode-se inferir

que tais compostos apresentam a atividade hipoglicemiante descrita neste trabalho, assim como apresentaram no estudo de Matsuda et al. (2002). No entanto, mais estudos abrangendo tais moléculas são necessários para confirmação da atividade biológica relacionado às mesmas.

¹ SALDANHA, L. L; ALMEIDA, L. F. R; XIMESES, V. F.; VILLEGAS, W.; DOKKEDAL, A. L. Chemical characterization by HPLC – EST – MS/MS, radical – scavenger and allelopathic activity of *Myrcia bella* Cambess. leaves extract. A ser publicado pela Journal of Natural Products.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a possível atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Myrcia bella* em camundongos induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar ingestão hídrica, ingestão alimentar e peso corpóreo de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg.
- Avaliar glicemia de jejum, triglicérides, colesterol total e proteínas totais de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg.
- Quantificar os níveis de glicogênio hepático e muscular de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg.
- Determinar a expressão das proteínas IRS-1, PI3-K e AKT, participantes da via de sinalização insulínica, assim como suas formas fosforiladas em fígado de camundongos normais e diabéticos tratados durante 21 dias com salina ou com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg.
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato bruto de *Myrcia bella* administrado em na dose única de 2000mg/Kg em camundongos normais.

3. Materiais e Métodos

3.1 - Obtenção do extrato e análises farmacognósticas e químicas

Conforme o aspecto multidisciplinar do grupo envolvido no Projeto Temático aprovado pela Fapesp sob o protocolo número 09/52237-9, a coleta e identificação do material botânico, a obtenção do extrato, a etapa farmacognóstica e o isolamento e identificação dos principais componentes do extrato, ocorreram sob a responsabilidade de outros membros do grupo, sobretudo da Profa. Dra. Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro (FC, UNESP, Bauru).

3.2- Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albino machos com 60±10 dias de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP, localizado no Campus de Botucatu, SP e do Biotério Central da Unicamp, Cemib, Unicamp, SP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclo de iluminação claro-escuro (12 horas), com livre acesso à comida e água, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Odontologia da Unesp Araçatuba (Processo número 01741-2012 – Anexo 1).

3.3 - Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”

Camundongos Swiss machos foram divididos em 2 grupos (n=10) (CTL SAL e CTL EXT), deixados em jejum por um período de 4 horas. Após este período foi administrado, por gavagem, salina (1mL/Kg) ou extrato bruto de *M. bella* na dose de 2000mg/Kg, de acordo com os grupos. Os animais tiveram seus comportamentos observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos após a realização da gavagem (anexo 2). Os parâmetros avaliados pelo “screening” hipocrático são descritos por Brito (1994). Após observação comportamental, os animais tiveram seus pesos analisados durante 14 dias e ao final deste período todos os animais foram mortos por decapitação para análise e peso de alguns órgãos vitais (fígado, rins, pulmão, coração e baço). Os dados foram expressos pelo arcosseno do peso do órgão/peso do animal.

3.4- Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes foi realizada através de injeção única de estreptozotocina (Sigam® - St. Louis, MO) (STZ) na dose de 150mg/kg, em camundongos em jejum de 12 a 14 horas. A STZ foi dissolvida em tampão citrato (pH 4,5), e injetada por via intraperitoneal. Os animais foram deixados em jejum por mais 3 horas após a injeção. Após um período de 7 dias, os camundongos foram novamente deixados de jejum (10 a 12 horas) e a glicemia foi medida com glicosímetro (One Touch – Johnson & Johnson). Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 250mg/dL foram considerados diabéticos e incluídos nos diferentes grupos.

3.5 – Divisão dos Grupos

Para formar os grupos experimentais os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos:

- Grupo controle salina (CTL SAL): animais normais tratados com salina.
- Grupo controle tratado (CTL EXT): animais normais tratados com extrato bruto de *Myrcia bella*.
- Grupo diabético salina (STZ SAL): animais induzidos ao diabetes pela administração de estreptozotocina e tratados com salina.
- Grupo diabético tratado (STZ EXT) : animais induzidos ao diabetes por administração de estreptozotocina e tratados com extrato bruto de *Myrcia bella*.

3.6 - Tratamento com salina e com extrato bruto de *Myrcia bella*

Os animais CTL SAL e STZ SAL receberam diariamente, por gavagem, solução salina (0,9g NaCl/100 mL água) na dose de 1mL/Kg, durante 21 dias consecutivos. Os animais dos grupos CTL EXT e STZ EXT receberam diariamente, por gavagem, extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg (diluído em salina) de peso corpóreo durante 21 dias consecutivos. A gavagem foi realizada uma vez ao dia, sempre no mesmo horário, entre 7 e 9 horas da manhã. Ao final do tratamento, os camundongos foram mortos por decapitação e foram coletados sangue para análises bioquímicas, fígado e músculo gastrocnêmio para determinação do conteúdo de glicogênio e fígado para expressão proteica por Western Blott.

3.7 - Avaliação da glicemia de jejum

Animais de todos os grupos foram deixados em jejum de 10 a 12 horas e tiveram a glicemia medida com Glicosímetro (One Touch Jonshon & Jonshon) a cada sete dias do tratamento.

3.8 - Avaliação da Ingestão Hídrica e Alimentar

Animais de todos os grupos tiveram suas ingestões hídrica e alimentar mensuradas diariamente.

A ingestão alimentar foi corrigida pelo peso dos animais e expressa em gramas/Kg de peso.

3.9 – Avaliação do Peso Corpóreo

Animais de todos os grupos foram pesados diariamente durante o tratamento em balança eletrônica (Fiziola) e os pesos expressos em gramas.

3.10 – Avaliação dos Parâmetros bioquímicos

Ao final do tratamento, os camundongos de todos os grupos foram deixados em jejum por um período de 12 horas. Após esse período, os animais foram decapitados e o sangue coletado foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para quantificação de triglicérides, colesterol total e proteínas totais através de kits comerciais (Doles®, Goiás, Brasil) e quantificados em espectrofotômetro (BioTek® – PoweWave XS).

3.11 – Avaliação do Glicogênio hepático e muscular

Foram removidos cerca de 300 a 500mg de amostras de fígado e cerca de 150 a 300mg de músculo gastrocnêmio dos animais de todos os grupos estudados e digeridos em 2 mL de solução de KOH 30% em tubos Falcon em banho Maria fervente por 1 hora. Após esta fase, foi acrescentado 0,2mL de Na₂SO₄ e o material foi agitado. Em seguida, foi adicionado 6,0mL de etanol, agitado novamente e levado ao banho Maria. O material foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22 °C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi então ressuspenso em 2 mL de água destilada quente. Posteriormente, foi acrescentado 6,0mL de etanol e o material foi agitado e aquecido em banho Maria e novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos a 22°C. O precipitado foi diluído em 15 uL de solução fenol e 2 mL de ácido sulfúrico. Após

diluição do precipitado o conteúdo foi levado ao banho fervente por 15 minutos e então foi quantificado por espectrofotometria a 490nm (RAFACHO et al., 2007).

3.12 - Extração proteica e Western blott

Porções do fígado foram homogeneizadas (Polytron PT 1200C) em coquetel anti-protease a 4°C. Após 20 minutos de centrifugação em 12.000 rpm à 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 100 µg de proteína total foram fervidas a 100°C por 4 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (fosfato de Na 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas em sistema de eletroforese (Mini Protean II - Bio-Rad) em gel de poliacrilamida com o tamanho dos poros adequado para cada peso molecular. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% de metanol e 0,02% de SDS em voltagem constante de 120 Volts. A membrana foi então saturada com solução bloqueadora contendo BSA 5% em solução basal (10mM Trisma base, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) “overnight”. Em seguida a membrana foi lavada com solução basal a temperatura ambiente (TA). As proteínas foram detectadas na membrana após incubação por 3h a 4 °C com anticorpo primário específico para cada uma em solução basal contendo albumina 3%, seguida de lavagem e incubação por uma hora e meia com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP em solução basal contendo leite desnatado 1% a TA. As membranas foram lavadas e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce) e expostas ao filme auto-radiográfico (Kodak T-Mat G/RA). As intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria (RAFACHO et al., 2007).

4. Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação múltipla de resultados paramétricos foi utilizado ANOVA seguido de *post test Tukey* e, para comparação de dois grupos, teste t de Student. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

5 .*Resultados*

5.1 – Teste Toxicidade Aguda e “Screening Hipocrático”

O extrato bruto de *Myrcia bella* administrado na dose de 2000mg/Kg em animais normais (CTL EXT), não causou nenhuma alteração nos parâmetros comportamentais analisados em relação aos animais tratados apenas com salina (CTL SAL) (anexo 2). Não ocorreram mortes ao longo do período de 14 dias de observação. Os pesos dos animais não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos (Figura5). Órgãos como fígado, baço, rins, pulmões e coração foram pesados (g) e divididos pelo peso dos animais (Kg). Ocorreu aumento no peso dos rins dos animais tratados com extrato ($14,27\pm 0,47$) em relação aos tratados com salina ($12,72\pm 0,71$), $p < 0,05$, $n=10$ (tabela 1). Não houve diferença significativa em relação ao peso dos demais órgãos.

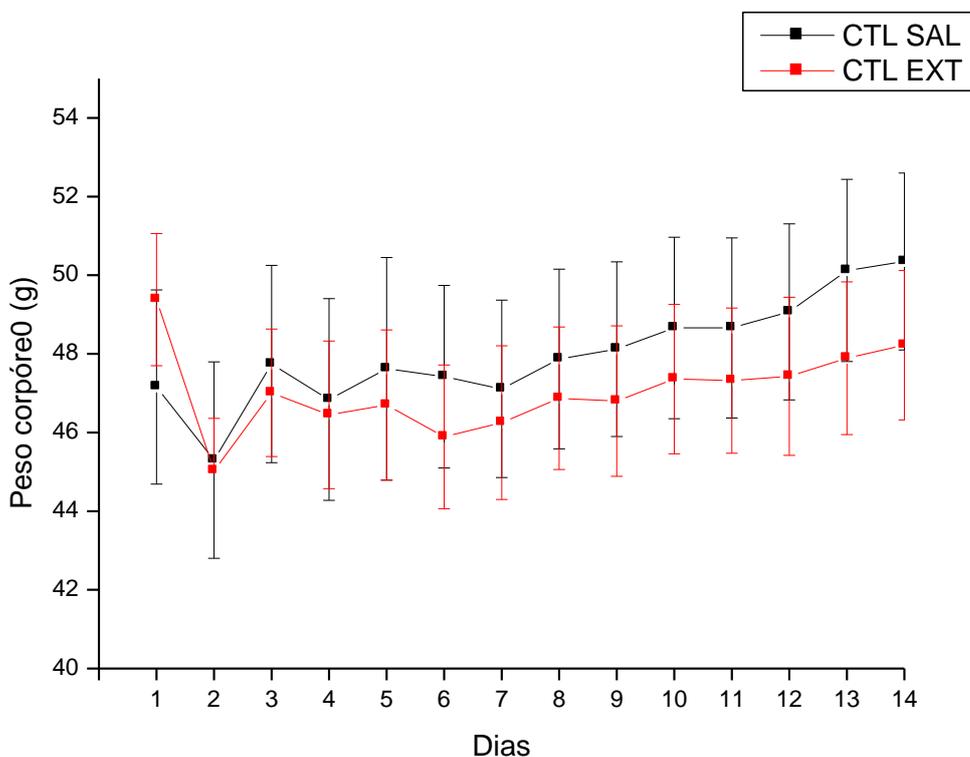


Figura 5 – Efeito da administração aguda de salina (CTL SAL) e do extrato bruto de *M. bella* (2000mg/Kg – CTL EXT) sobre o peso corpóreo de camundongos normais, $n=10$. Teste *t Student*.

Tabela 1 - Efeito da administração aguda de salina (1mL/Kg) ou do extrato bruto de *M. bella* (2000mg/Kg) sobre o peso dos órgãos de camundongos machos.

| Peso dos órgãos (g/Kg) | CTL SAL | CTL EXT |
|------------------------|-------------|-------------|
| Baço | 4,04±0,32 | 4,71±0,53 |
| Coração | 4,81± 0,12 | 5,06± 0,24 |
| Fígado | 55,85± 1,72 | 58,66± 1,29 |
| Pulmão | 8,94± 0,92 | 9,67 ±0,36 |
| Rim | 12,73±0,41 | 14,27±0,47* |

CTL SAL – animais normais tratados com salina. CTL EXT – animais normais tratados com extrato bruto de *M. bella* (2000mg/Kg). Valores expressos como média ± S.E.M. *vs CTL SAL, p<0,05, n=10. Teste *t Student*.

5.2 – Avaliação da Glicemia de Jejum

Os animais diabéticos induzidos com estreptozotocina (STZ SAL) apresentaram valores de glicemia de jejum estatisticamente superiores em relação aos animais do grupo controle tratados com salina (CTL SAL) (p<0,001), confirmando a efetividade do estabelecimento do diabetes. Os animais diabéticos tratados durante 21 dias com o extrato bruto de *M. bella* apresentaram diminuição da glicemia a partir do sétimo dia de tratamento, quando comparados com os animais diabéticos tratados com salina, mantendo-se até o final do mesmo (Figura 6) (p<0,05). No sétimo dia de tratamento ocorreram 36% de diminuição da glicemia de jejum dos animais STZ EXT quando comparados aos animais do grupo STZ SAL, seguido de 41,3% e 33,3% no 14º e 21º dia, respectivamente. Não houve diferença na glicemia entre os animais dos grupos controle (CTL SAL e CTL EXT).

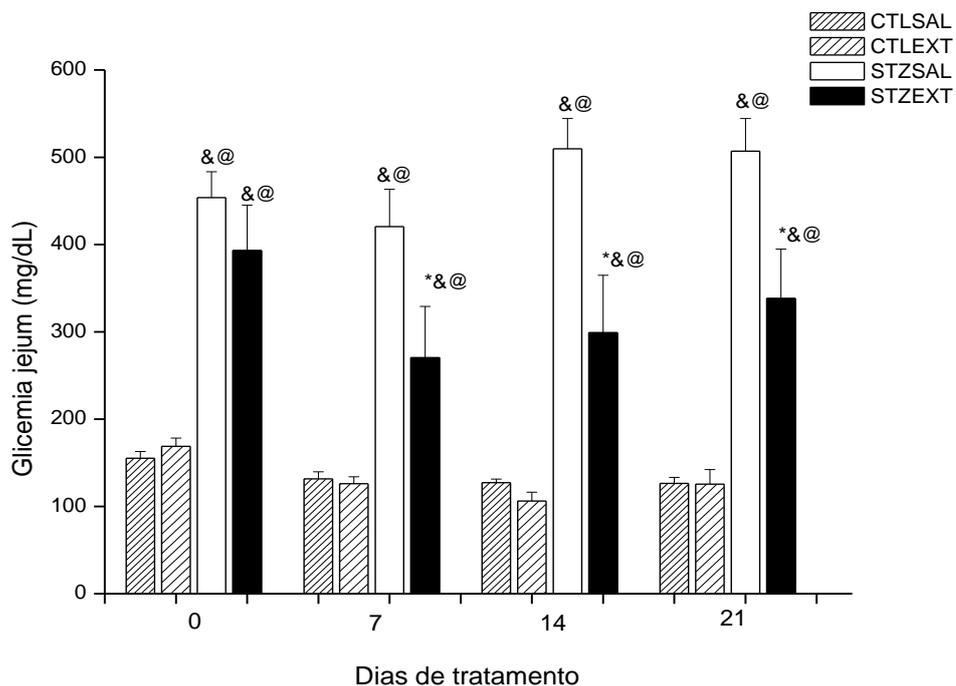


Figura 6 – Glicemia de jejum (mg/dL) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de *M. Bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). * vs STZ SAL; @ vs CTL SAL, & vs STZ EXT, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.3 – Avaliação da Ingestão Hídrica e Alimentar

Animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) apresentaram aumento significativo na ingestão hídrica em relação ao grupo controle tratado com salina (CTL SAL) ($p < 0,001$), sintoma característico do quadro diabético, denominado polidipsia. Animais diabéticos tratados com extrato bruto de *M. bella* (STZ EXT) apresentaram diminuição de 42% na ingestão hídrica quando comparados aos animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) (Figura 7) ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos controles (CTL SAL e CTL EXT).

Em relação à ingestão alimentar, animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle tratado com salina (CTL SAL) ($p < 0,001$), sintoma característico do quadro diabético, denominado polifagia. Animais diabéticos tratados com extrato bruto de *M. bella* (STZ EXT)

apresentaram diminuição de 38,46% na ingestão alimentar comparados aos animais diabéticos tratados com salina (Figura 8) ($p < 0,001$). Não houve diferença entre os grupos controles (CTL SAL e CTL EXT).

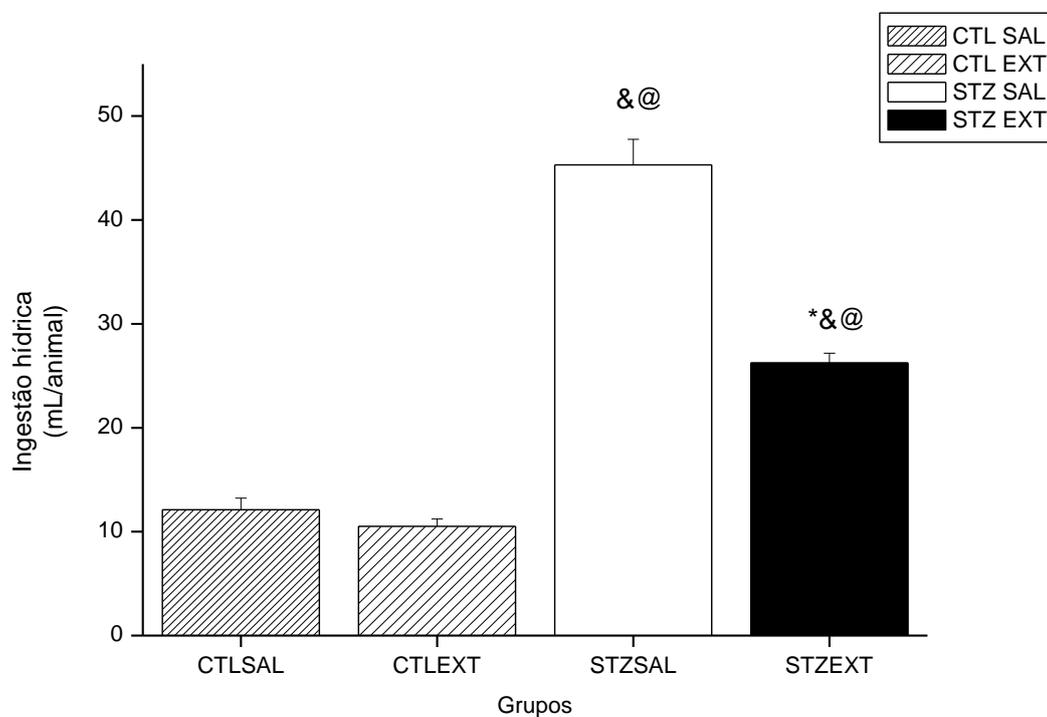


Figura 7 - Ingestão hídrica (mL/animal) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. Bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). *vs STZ SAL; @vs CTL SAL, & vs STZ EXT, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

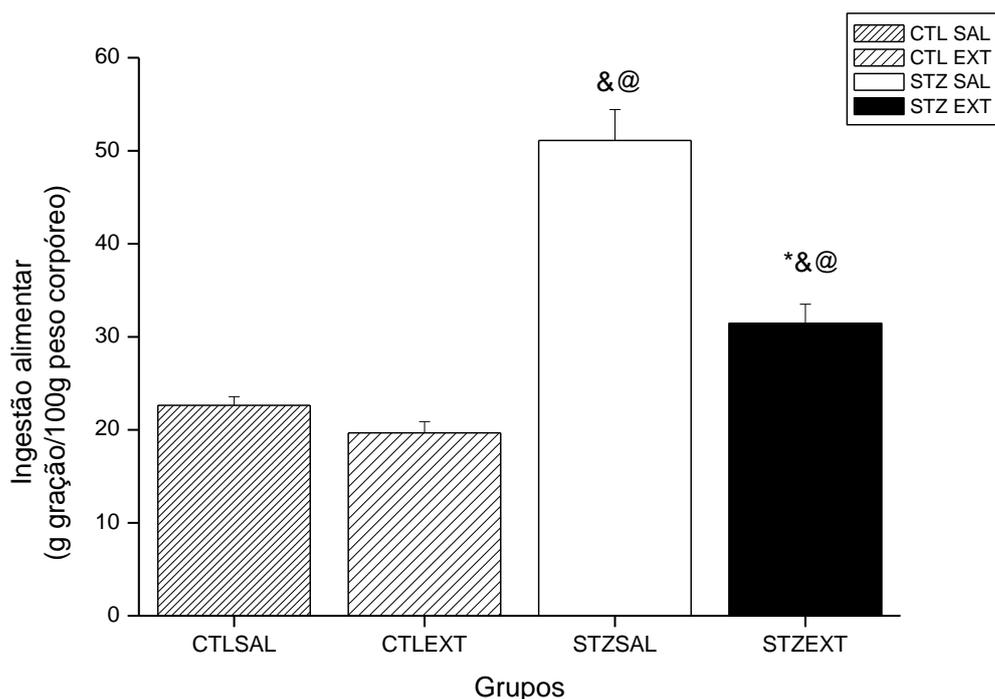


Figura 8 - Ingestão alimentar (g ração/100g peso corpóreo) de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. Bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). *vs STZ SAL; @vs CTL SAL, & vs STZ EXT, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.4 – Avaliação do Peso Corpóreo

O peso dos animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) apresentou diminuição significativa em relação ao peso dos animais controle normais tratados com salina (CTL SAL) a partir do sétimo dia de tratamento, mantendo-se inferior até o final do mesmo ($p < 0,05$) (Figura 9).

Ocorreu diminuição do peso dos animais controles tratados com extrato (CTL EXT) em relação aos animais controles tratados com salina (CTL SAL) no sétimo e décimo quarto dia de tratamento ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre os pesos dos animais diabéticos dos grupos STZ SAL e STZ EXT.

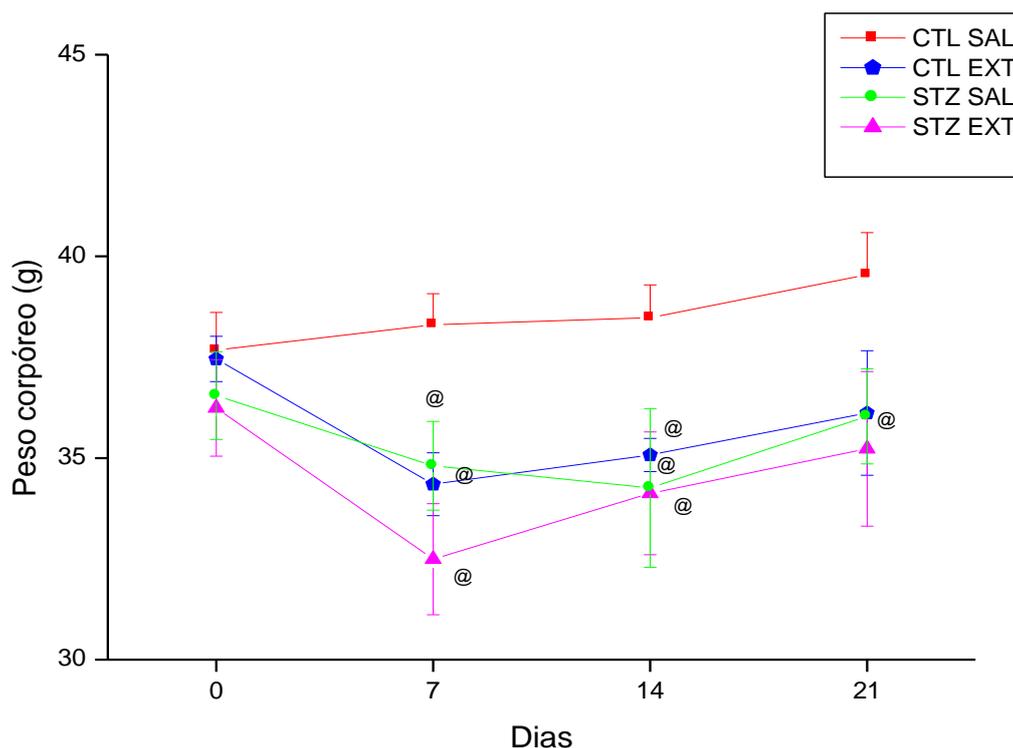


Figura 9 – Peso corpóreo de animais controles e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. Bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). @vs CTL SAL, $p < 0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.5 – Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos Plasmáticos

A tabela 2 apresenta os parâmetros bioquímicos avaliados e suas diferenças entre os grupos estudados. Os níveis de triglicérides mensurados a partir do soro coletado estiveram aumentados em animais diabéticos do grupo STZ SAL quando comparados aos animais dos grupos CTL SAL. O mesmo ocorreu em relação aos níveis de colesterol total. O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* provocou diminuição dos níveis de triglicérides e colesterol total dos animais normais e diabéticos (CTL EXT e STZ EXT) em relação aos animais normais e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) respectivamente, $p < 0,05$ (Tabela 2). A diminuição foi de 24,8% e 45,5% em relação aos níveis de triglicérides de animais dos grupos CTL EXT e STZ EXT quando comparados aos grupos CTL SAL E STZ SAL, respectivamente e de 41,4% e 48,6% em relação aos níveis de colesterol dos animais dos grupos CTL EXT e STZ EXT quando

comparados aos grupos CTL SAL e STZ SAL, respectivamente. Não houve diferença nos níveis séricos de proteínas totais entre os animais de todos os grupos.

Tabela 2– Parâmetros bioquímicos de animais controle e diabéticos tratados com salina ou com extrato bruto de *M. bella* na dose de 600mg/Kg.

| Parâmetros | CTLSAL | CTLEXT | STZSAL | STZEXT |
|--------------------------|------------|------------|-------------|-------------|
| Triglicérides (mg/dL) | 105,1±12,5 | 79±17,88@ | 128,9±11,9& | 70,2±8,18* |
| Colesterol total (mg/dL) | 142,9±12 | 83,6±14,8@ | 172,4±16,1& | 88,5±11,3*@ |
| Proteínas totais (mg/dL) | 4,89±1,37 | 3,9±0,94 | 2,7±0,47 | 3,59±0,37 |

CTL SAL – animais controle não diabéticos tratados com salina, CTL EXT – animais controles não diabéticos tratados com extrato bruto de *M. bella*, STZ SAL – animais diabéticos tratados com salina, STZ EXT – animais diabéticos tratado com extrato bruto de *M. bella*. Valores expressos como média ±S.E.M. *vs STL SAL, &vs CTL EXT, @vs CTL SAL, p<0,05, n=8. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.6 – Avaliação do Glicogênio Hepático e Muscular

Os conteúdos de glicogênio hepático e muscular de animais diabéticos induzidos por estreptozotocina e tratados com salina (STZ SAL) estiveram diminuídos em relação ao grupo controle tratado com salina (CTL SAL) (Figuras 10 e 11) (p<0,05). O tratamento com extrato bruto de *M. bella* provocou aumento nos níveis de glicogênio hepático em animais diabéticos tratados (STZ EXT) (0,27±0,08) quando comparados aos animais do grupo STZ SAL (0,11±0,03) (p<0,05). Não houve diferença entre os grupos controles. Não houve alteração no glicogênio muscular de animais diabéticos tratados com extrato (STZ EXT) comparado aos animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) (s 11).

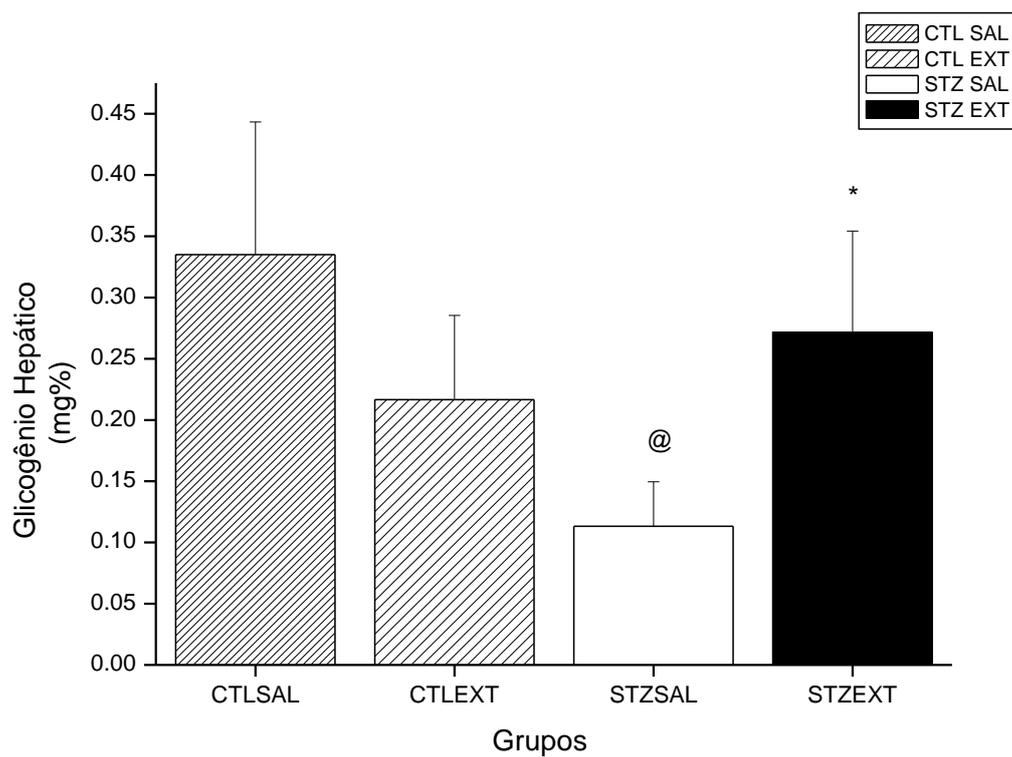


Figura10 - Glicogênio hepático (mg%) de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). *vs STZ SAL, @ vs CTL SAL, $p < 0,05$, $n = 8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

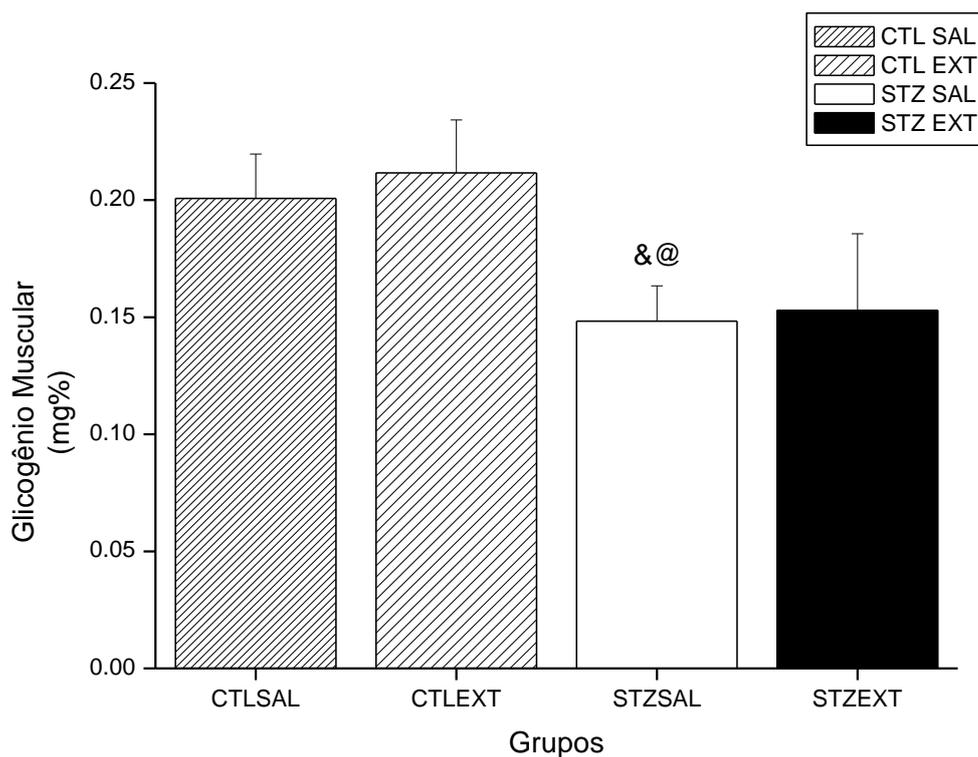


Figura 11 – Glicogênio muscular (mg%) de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). @vs CTL SAL &vs CTL EXT, $p<0,05$, $n=8$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

5.7 – Análise da Expressão proteica por Western blott

Através da técnica de Western blott, foram analisados as expressões de algumas proteínas da via de sinalização insulínica em fígado dos animais de todos os grupos. Foram analisadas a expressão da forma total e fosforilada das proteínas IRS-1, PI3-K e AKT, corrigidas pelo controle interno (beta-actina). A relação p-IRS-1/IRS-1 apresentou aumento em animais do grupo STZ EXT ($1,25\pm 0,29$) quando comparados ao grupo dos animais STZ SAL ($0,36\pm 0,14$) (Figura 12), $p<0,05$. Não houve diferença entre o grupo STZ SAL em relação ao grupo CTL SAL. A relação p-PI3-K/PI3-K apresentou aumento em animais do grupo STZ EXT ($0,76\pm 0,1$) quando comparados aos animais diabéticos dos grupos STZ SAL ($0,48\pm 0,09$) (Figura13), $p<0,05$. Também não houve diferença entre o grupo STZ SAL em relação à CTL SAL. A relação p-

AKT/AKT mostrou aumento em animais diabéticos do grupo STZ EXT ($1,5\pm 0,23$) quando comparados aos animais do grupo STZ SAL ($0,88\pm 0,07$) (Figura 14), $p < 0,05$. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos STZ SAL e CTL SAL.

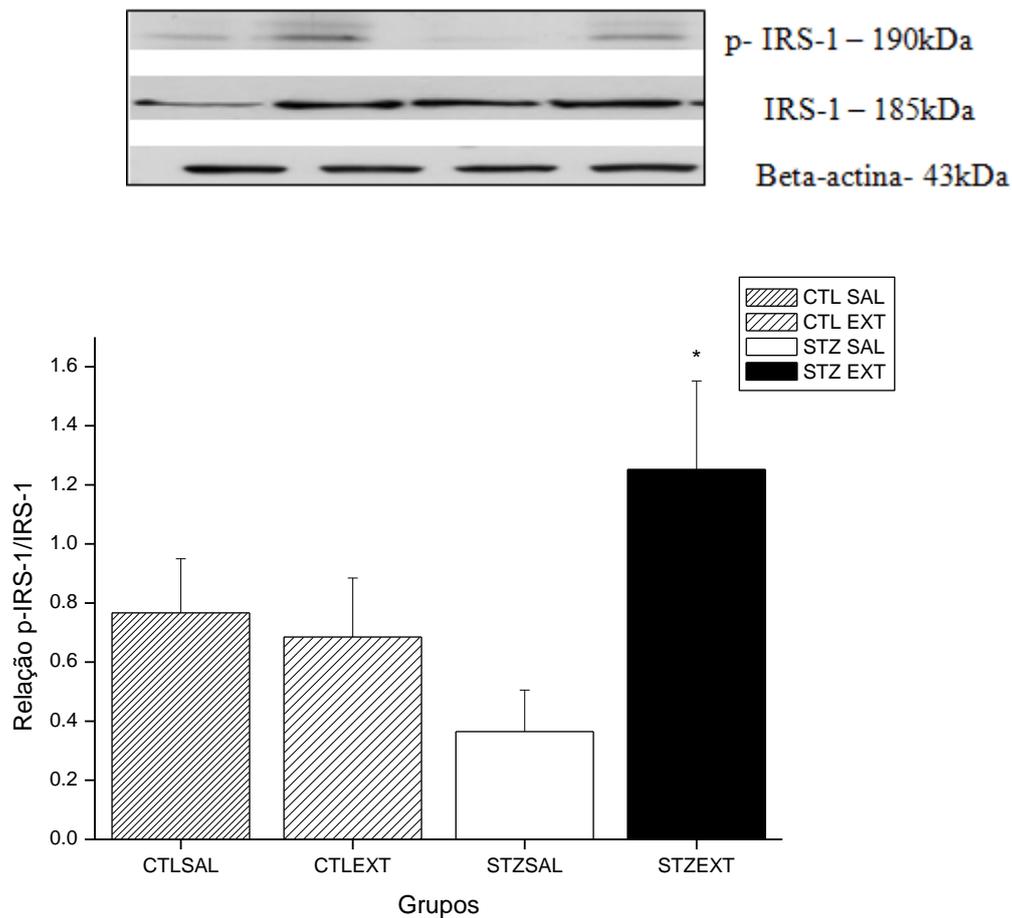


Figura 12 –Expressão proteica de IRS-1 de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). Os resultados indicam a relação entre as formas fosforilada e total. *vs STZ SAL, $p < 0,05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

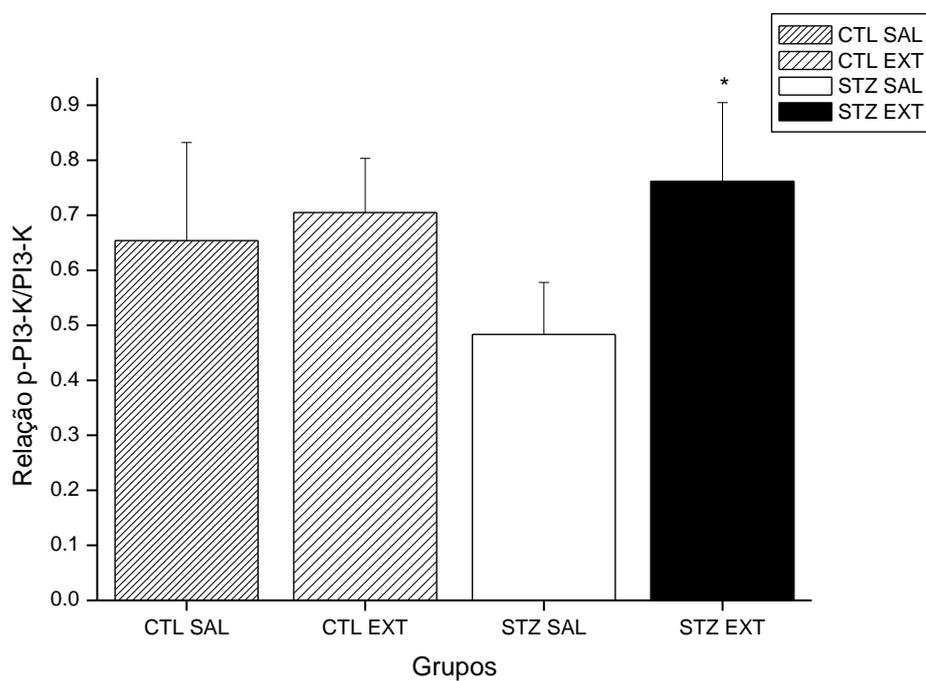
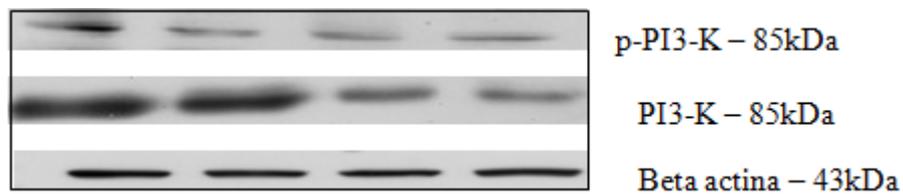


Figura 13 –Expressão proteica de PI3-K de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). Os resultados indicam a relação entre as formas fosforilada e total. *vs STZ SAL, $p < 0,05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

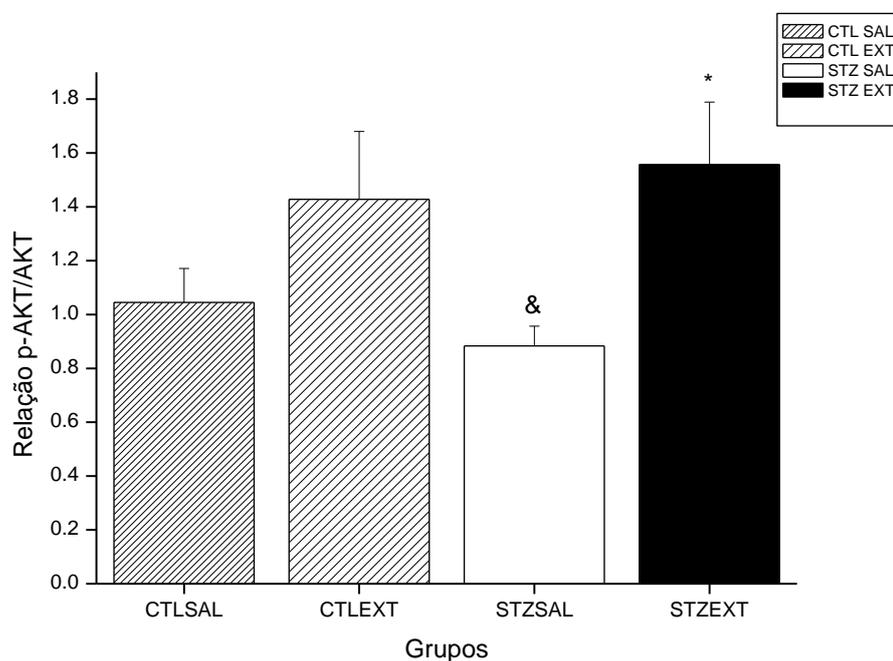
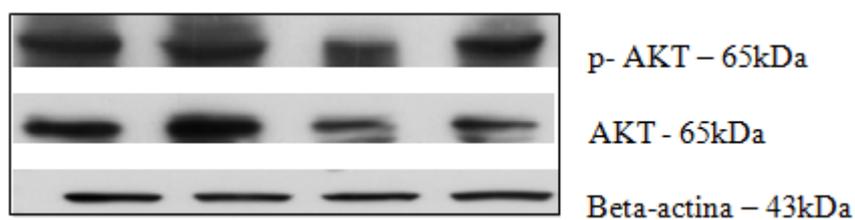


Figura 14 –Expressão proteica de AKT de animais controle e diabéticos tratados com salina (CTL SAL e STZ SAL) ou com extrato bruto de *M. bella* durante 21 dias na dose de 600mg/Kg (CTL EXT e STZ EXT). Os resultados indicam a relação entre as formas fosforilada e total. *vs STZ SAL, &vs CTL EXT, $p < 0,05$, $n = 6$. ANOVA seguido de *post test Tukey*.

6. Discussão

O uso de espécies vegetais para tratamento e melhora de sintomas ou doenças é conhecido desde o início da civilização. Nos últimos anos, as plantas medicinais tornaram-se alvo de pesquisas científicas para comprovação dos seus efeitos e melhor entendimento de seus mecanismos de ação (KUMAR et al., 2005). Antes do advento da insulina exógena e dos hipoglicemiantes orais já conhecidos, o uso de plantas era a principal forma de controle do diabetes (GRAY; FLATT 1999). Os atuais tratamentos para o diabetes incluem a insulinoterapia e tratamento com hipoglicemiantes orais, que agem na redução da glicemia a partir de inúmeros mecanismos (HSU et al., 2009). Tais mecanismos incluem a redução da produção de glicose hepática (através da redução dos processos de glicogenólise e neoglicogênese), aumento na secreção de insulina pelas células beta do pâncreas, melhora da sensibilidade à insulina dos tecidos periféricos e inibição da absorção da glicose intestinal (CHENG; FUNTUS, 2005). No entanto, tais drogas podem apresentar efeitos indesejáveis aos pacientes que fazem uso das mesmas, além de diminuição da resposta ao longo do tratamento. A partir disso, a pesquisa por agente que possam ter efeitos semelhantes aos já obtidos atualmente, porém que ofereçam menos efeitos colaterais tornou-se alvo de pesquisa. É nesse contexto que se encontra o interesse pela pesquisa com plantas medicinais. Sabe-se que as plantas medicinais possuem princípios ativos que podem agir na diminuição da glicose sanguínea e consequente melhora no quadro diabético (ABDEL –HASSAN; ABDEL –BARRY; MOHAMMEDA, 2000) e que tais mecanismos são muito semelhantes aos mecanismos dos hipoglicemiantes orais utilizados atualmente (TANIRA, 1994), o que torna a busca por novos agentes naturais ainda mais interessante por parte dos pesquisadores.

Desse modo, determinados pela busca de novas opções terapêuticas, este estudo dedicou-se à investigação da ação hipoglicemiante do extrato bruto de uma planta proveniente do cerrado brasileiro, *Myrcia bella*, seus possíveis mecanismos de ação, avaliando, também, seu potencial efeito tóxico.

O teste de toxicidade aguda foi realizado administrando uma única e alta dose do extrato em camundongos normais. Após a administração do extrato, foram realizadas observações comportamentais sistemáticas para avaliar o “screening” hipocrático que fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre

o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo (MALONE; ROBICHAUD,1983).

Nos estudos de toxicidade, observações clínicas, peso dos órgãos e alterações do peso corporal podem fornecer indicadores úteis do estado de saúde geral do animal (JAHN; GUNZEL, 1997). Os animais tratados com o extrato não apresentaram manifestações comportamentais atípicas referentes ao “screening” hipocrático avaliado e também não ocorrem mortes ao longo do período de observação. O peso dos animais, avaliado durante 14 dias após o tratamento com dose única, não apresentou diferença significativa entre os animais tratados com o extrato comparado com aqueles tratados com salina. O peso dos órgãos dos animais analisado 14 dias após da administração do extrato indicou aumento no tamanho dos rins dos animais tratados com extrato em relação àqueles tratados com salina. Os rins exercem múltiplas funções que podem ser caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endócrinas e metabólicas. A função primordial dos rins é a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno predominantemente pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos e excreção de outras substâncias (SODRÉ et al., 2007). Desse modo, uma vez que foi observado alteração no tamanho dos mesmos, julga-se importante o estudo mais aprofundado da toxicidade do extrato em relação a este órgão, para garantir a segurança do uso futuro do extrato de *Myrcia bella* em humanos.

A hiperglicemia decorrente do DM é consequência dos defeitos ou da falta da ação da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). Os trabalhos utilizando modelos de diabetes experimental em roedores têm sido amplamente utilizados na reprodução da sintomatologia do DM, uma vez que esses animais apresentam semelhanças clínicas, laboratoriais e histológicas com o diabetes humano. Após a administração da STZ os níveis glicêmicos sofrem alterações características do DM, incluindo inicialmente hiperglicemia e hiperinsulinemia, seguida de hipoglicemia transitória e finalmente, a hiperglicemia crônica (CARVALHO; CARVALHO; FERREIRA, 2003). O modelo experimental de indução de diabetes pela STZ utilizado neste trabalho comprovou que a mesma agiu na provável destruição das células beta dos animais a julgar pelo aumento significativo da glicemia de jejum dos camundongos induzidos (acima de 400mg/dL) em relação à glicemia dos animais normais, caracterizando um modelo de diabetes tipo 1. O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* na dose de 600mg/Kg durante 21 dias, revelou que o mesmo apresenta atividade

hipoglicemiante em animais diabéticos, visto a diminuição da glicemia dos mesmos. A glicemia de jejum dos animais dos grupos estudados, ao ser mensurada a cada sete dias do tratamento, mostrou-se diminuída a partir do 7º dia de tratamento nos animais diabéticos tratados com o extrato, mantendo-se diminuída em relação aos animais diabéticos tratados com salina até o final. Como já mencionado, a hiperglicemia decorrente do DM1 deve-se à ausência de insulina que tem a função de promover a captação e armazenamento da glicose nos tecidos, além de inibir os processos de degradação da mesma. Estudos recentes têm mostrado que os flavonoides presentes nas plantas podem agir na diminuição da glicose sanguínea em modelos de diabetes experimentais. Tais estudos utilizando flavonoides isolados, como a mirecetina e quercetina, mostraram que o tratamento com os mesmos promoveu diminuição da glicemia de jejum de animais diabéticos induzidos por STZ. Pode-se sugerir, portanto, que os flavonoides presentes no extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* participem da redução da glicemia, a partir de mecanismos que envolvam a redução da produção hepática de glicose e/ou promovam o estoque de glicose em fígado em consequência da expressão de proteínas envolvidas nesses processos, como descrito a seguir.

O órgão “chave” no processo de armazenamento de glicose na forma de glicogênio é o fígado. Neste, através da ação da insulina, a glicose captada é armazenada na forma de glicogênio, que será utilizado em situações onde haja diminuição dos níveis glicêmicos. Em situações como no diabetes, portanto, o “estoque” de glicose na forma de glicogênio está diminuído, pela ausência do processo de glicogênese e pela ativação dos processos de glicogenólise e neoglicogênese. Como observado nos resultados obtidos, os níveis de glicogênio hepático e muscular mostraram-se diminuídos nos animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL) em relação aos animais controles normais tratados com salina (CTL SAL). O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* promoveu aumento no conteúdo de glicogênio hepático de camundongos diabéticos tratados (STZ EXT) em comparação com os animais do grupo STZ SAL. Tal aumento pode ser sugerido pela ativação da glicogênese neste órgão e/ou inibição dos processos como a glicogenólise e neoglicogênese. Os níveis de glicogênio muscular de animais diabéticos não foram afetados pelo tratamento, não permitindo afirmar, portanto, que o extrato agiu na diminuição da glicemia através da captação da mesma em tecido muscular.

A fim de investigar mais profundamente os mecanismos envolvidos na diminuição dos níveis glicêmicos dos animais diabéticos e dos processos de armazenamento de glicose no fígado, uma vez que os níveis hepáticos de glicogênio estiveram aumentados em animais do grupo STZ EXT, a expressão de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica foi analisada. A via PI3-K/AKT, descrita anteriormente, é a principal via ativada pela insulina através de seu receptor (IR). A partir da sua ativação ocorre uma cascata de eventos, mediada pela interação proteína-proteína, que leva às ações metabólicas da insulina. A avaliação da expressão das proteínas da via PI3-K/AKT estudadas neste trabalho não deixam dúvidas a respeito da ação do tratamento com o extrato sobre as mesmas. A proteína PI3-K, ativada pela insulina é responsável, dentre outras funções, pela fosforilação e ativação da proteína AKT que, uma vez fosforilada, é responsável por armazenar glicose no fígado e impedir os processos degradativos da mesma. A AKT tem sua ação no armazenamento e inibição dos processos degradativos através do aumento ou diminuição na transcrição de genes e enzimas envolvidos em tais processos. O tratamento com o extrato bruto de *Myrcia bella* em animais diabéticos (STZ EXT) resultou no aumento na expressão das proteínas IRS-1, PI3-K e AKT em comparação com os animais diabéticos tratados com salina (STZ SAL). Tais resultados mostram-se interessantes, podendo-se inferir, portanto, que o aumento da expressão de tais proteínas pode estar envolvido no aumento dos níveis de glicogênio hepático observado nos animais diabéticos tratados e, conseqüentemente, na diminuição da glicemia de jejum dos mesmos.

Os sintomas característicos do diabetes incluem aumento da ingestão hídrica (polidipsia) e da ingestão alimentar (polifagia) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011). O aumento da ingestão alimentar que ocorre nessa síndrome pode ser atribuído a distúrbios nos processos de regulação da fome pelo centro da saciedade, localizado no núcleo hipotalâmico ventro-medial, que necessita de insulina para a captação de glicose. Uma vez que a glicose é captada, o centro da fome é inibido. Portanto, em situações como o diabetes, onde ocorre ausência de insulina, o núcleo hipotalâmico ventro-medial não capta glicose e o centro da fome, portanto, não é inibido. Esta área, uma vez não inibida, sinaliza falta de glicose e fome, estimulando assim a maior ingestão alimentar (JACOBSON, 1996). O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* promoveu melhora no quadro de polifagia dos animais do grupo STZ EXT, observado pela diminuição da ingestão alimentar quando comparados aos animais

do grupo STZ SAL. A polidipsia presente nos animais diabéticos ocorre devido à hiperosmolaridade sanguínea, em razão de altos níveis de glicose circulante, que faz a água passar do meio intracelular para o extracelular a fim de manter o equilíbrio osmótico. A desidratação intracelular é reconhecida pelos osmorreceptores cerebrais que geram uma resposta desencadeando a sede intensa característica do diabetes (LERCO et al., 2003). O tratamento com extrato bruto de *Myrcia bella* promoveu diminuição no sintoma de polidipsia em relação aos animais diabéticos tratados apenas com salina, pelo provável reequilíbrio osmótico, uma vez que houve diminuição da hiperglicemia no grupo tratado. A diminuição nos níveis glicêmicos do sangue, promovida pelo extrato bruto de *Myrcia bella* através dos prováveis mecanismos já discutidos anteriormente, levou à consequente regulação da osmolaridade sanguínea, diminuindo, portanto, a perda de água e necessidade de maior ingestão hídrica.

Outro sintoma característico do diabetes e que pode ser observado a partir do modelo de indução escolhido nesse trabalho, é a significativa perda de peso, que se deve à perda ou degradação de proteínas estruturais, responsáveis pela rigidez, consistência e elasticidade dos tecidos, e também devido ao aumento da lipólise. A insulina é responsável por regular o metabolismo dos carboidratos e por influenciar a síntese de proteínas e de RNA, além de ser responsável pela formação e armazenamento de lipídios. Desse modo, este hormônio facilita o transporte de glicose para as células musculares e para os adipócitos, aumenta a síntese e armazenamento de proteínas celulares, de glicogênio no músculo e dos triglicerídeos nos adipócitos, além de diminuir o catabolismo proteico (MAY; BUSE, 1989). Na ausência de insulina, portanto, tais processos de síntese proteica e armazenamento de triglicérides estão drasticamente diminuídos, ocorrendo, na verdade, proteólise muscular e lipólise, o que contribui para diminuição do peso corpóreo. Os animais diabéticos estudados neste trabalho apresentaram significativa perda de peso em relação aos animais controle tratado com salina (CTL SAL), enquanto os animais desse último grupo apresentaram ganho de peso no decorrer do tratamento. O tratamento com o extrato bruto de *Myrcia bella* não preveniu a perda de peso decorrente do diabetes nos animais do grupo STZ EXT, pois não houve diferenças significativas entre o peso destes e dos animais do grupo STZ SAL ao longo do tratamento. No entanto, animais normais tratados com extrato (CTL EXT) apresentaram também perda significativa de peso quando

comparados aos animais normais tratados com salina (CTL SAL) ao longo de todo o tratamento.

A deficiência na produção de insulina no diabetes apresenta, como consequência, alterações no metabolismo lipídico pela ausência do efeito da insulina em promover a lipogênese e inibir a lipólise, ocasionando, nesta situação, aumento significativo de triglicerídeos plasmáticos, provavelmente em decorrência da elevada síntese de triglicerídeos a partir dos ácidos graxos que chegam ao fígado, em virtude de maior lipólise no tecido adiposo (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Como resultado, ocorre intensa síntese de VLDL hepática acompanhada de menor catabolismo da mesma pela menor atividade da lipase lipoproteica (JAIN; RAINS; CROAD, 2007). Observa-se aumento da lipólise no tecido adiposo, com elevação dos níveis de ácidos graxos sanguíneos e maior produção de corpos cetônicos pelo fígado (FORETZ et al., 1999). Em pacientes diabéticos, o metabolismo das lipoproteínas está prejudicado, pois a insulina exerce um efeito importante sobre as lipases, como a ativação da lipase lipoprotéica do endotélio vascular e a inibição da lipase hormônio sensível, presente no tecido adiposo. Na deficiência de insulina, a lipase hormônio sensível estará ativada, ocasionando a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos adipócitos, contribuindo para a diminuição de peso corporal e, além disso, elevação do substrato acetil-CoA, que é um precursor do colesterol. A ausência de insulina também inibirá a lipase lipoprotéica, diminuindo drasticamente a captação dos triacilgliceróis transportados pelas lipoproteínas (quilomicron, VLDL) pelos tecidos periféricos permanecendo, portanto, na circulação (CONTRERAS et al., 2000). As dislipidemias são complicações frequentemente encontradas em paciente diabéticos representando um sério risco para doenças cardiovasculares (YADAV; MOORTHY; BAQUER et al., 2005). A doença cardiovascular é a principal responsável pela redução de sobrevida de pacientes diabéticos, sendo a causa mais frequente de mortalidade, pois engloba grande variedade de distúrbios vasculares, incluindo infarto do miocárdio (LETHO et al., 1997). As anormalidades lipídicas mais comuns encontradas em paciente diabéticos são a hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia (KHAN; ABRAHAM; LEELAMMA, 1995; MITRA et al., 1995). Sabe-se que no diabetes induzido por STZ, o aumento dos níveis séricos de glicose é acompanhado pela elevação do colesterol e triglicerídeos plasmáticos, uma vez que a hiperglicemia é o maior determinante na alteração dos níveis totais de VLDL e triglicerídeos (LEHTO et al., 1997). Os animais diabéticos do

grupo STZ apresentaram altos níveis de triglicérides e colesterol, comprovando a hiperlipidemia característica do quadro diabético, induzida pela administração da STZ, pelos mecanismos já descritos anteriormente. Pode-se observar que os níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol tanto de animais controle tratados (CTL EXT) quanto diabéticos tratados com (STZ EXT) estão diminuídos em relação aos animais normais tratados com salina (CTL SAL). Os resultados obtidos mostraram-se interessantes, uma vez que o extrato reduziu também os níveis de triglicérides e colesterol de animais normais. Através desses resultados pode-se afirmar que o extrato possui atividade hipolipidêmica, diminuindo os níveis lipídicos tanto de animais diabéticos quanto de animais normais. Tal resultado mostra-se extremamente relevante, uma vez que uma das complicações decorrentes do diabetes refere-se aos riscos de doenças cardiovasculares devido ao aumento dos lipídios plasmáticos, como já descrito anteriormente.

Estudos têm mostrado que a ingestão de flavonoides e outros compostos fenólicos está associada à diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, uma vez que tais compostos estão envolvidos na diminuição dos níveis lipídicos no sangue. Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim as células dos radicais livres e, portanto, da peroxidação lipídica (KAHRAMAN et al., 2003). Além disso, apresentam propriedades estabilizadoras de membranas, podendo envolver processos do metabolismo intermediário (GALATI et al., 2002). Estudos acerca do metabolismo lipídico e o uso de flavonoides demonstraram que as concentrações plasmática e hepática de colesterol total e de triglicérides foram reduzidas enquanto o nível sérico de HDL sofreu aumento após a administração de flavonoides (BOK et al., 1999; SILVA et al., 2002). Trabalhos com ratos diabéticos tratados com flavonoides mostraram diminuição na concentração sérica tanto de colesterol quanto de triglicérides. (MIYAKE; YAMAMOTO; TSUJIHARA 1998; MENEZES et al., 2007). Como descrito anteriormente, estudos a respeito da química do extrato bruto de *Myrcia bella* mostram a presença, principalmente, de flavonoides. Pode-se sugerir, portanto, que a presença dos flavonoides no extrato administrado nos camundongos pode ter agido no metabolismo lipídico, através da sua possível atividade antioxidante, diminuindo os níveis de triglicérides e colesterol.

O presente trabalho, com o interesse de buscar novas formas de controle para o diabetes, teve como foco a investigação da atividade hipoglicemiante do extrato bruto de *Myrcia bella* e seus possíveis mecanismos de ação. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o mesmo apresenta atividade hipoglicemiante e hipolipidêmica, agindo a nível molecular na diminuição da glicemia. Tais resultados são de extrema importância, visto a necessidade de estudos que incorporem novos agentes hipoglicemiantes ao mercado. A pesquisa por plantas medicinais que possuam efeitos benéficos aos pacientes diabéticos tem mostrado um crescimento significativo nos últimos anos, pontualizando a necessidade, a importância e o enfoque de tais pesquisas.

Com o interesse de melhor compreensão e entendimento, o presente trabalho necessita de estudos adicionais que busquem identificar os mecanismos de ação do extrato em camundongos diabéticos, o que certamente envolve a melhor compreensão dos processos de glicogênese, neoglicogênese e glicogenólise em fígado, além de estudos a cerca da captação de glicose em tecidos periféricos.

7. Conclusão

A partir dos dados apresentados no presente trabalho pode-se concluir que o extrato bruto das folhas de *Myrcia bella* administrado na dose de 600mg/Kg durante 21 dias em camundongos diabéticos, possui atividade hipoglicemiante através da ativação de proteínas envolvidas na via de sinalização insulínica e captação e armazenamento de glicose em fígado, além de apresentar atividade hipolipidêmica, melhorando, portanto, o quadro diabético dos animais tratados. Os resultados indicam que *Myrcia bella* apresenta grande potencial dentro da área de pesquisa sobre plantas medicinais e nos encoraja ao aprofundamento dos estudos sobre suas propriedades medicinais.

8. *Referências*

ABDEL - HASSAN, I. A.; ABDEL - BARRY, J. A.; MOHAMMEDA, S. T. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol.**, v. 71, p. 325-330, 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v.34, n.1, p.S62-S69, 2011.

ARAUJO, L. M. B; BRITTO, M. M. S; PORTO DA CRUZ, T. R. Tratamento do diabetes mellitus do tipo 2: novas opções. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 44, n. 6, p. 509- 518, 2000.

BAILEY, C. J.; DAY, C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. **Diabetes Care**, v. 12, p. 553-564, 1989.

BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Metformin. **N Engl J Med.**, v. 334, p. 574-579, 1996.

BAVILONI, D. P.; SANTOS, M. P.; AIKO, G. M.; LIMA REIS, S. R.; LATORRACA, M. Q.; SILVA, V. C; DALL’OGLIO, E. L.; SOUSA JUNIOR, P. T.; LOPES, C. F.; BAVIEIRA, A. M.; KAWAHITA, N. H. Mechanism of anti-hyperglycemic action of *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae): Investigation in peripheral tissues. **J Ethnopharmacol.**, v. 131, p 135-139, 2010.

BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A.; MEKHFI, H.; TAHRI, A.; LEGSSYER, A. Medicinal plants with potential antidiabetic activity: A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). **Int J Diab Metabol.**, v.14, p. 1-25, 2006.

BOK, S.H.; LEE, S. H.; PARK, Y. B; BAE, K. H; SON K. H.; JEONG, T. S.; CHOI, M. S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rats fed, citrus peel extract or a mixture os citrus bioflavonoids. **J. Nutr.**, v.129, p.1182-1185, 1999.

BRADY, M. J.; NAIRN, A. C.; SALTIEL, A. R. The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. **J Biol Chem** ., v. 272 p. 698–703. 1997.

BRITO, A. R. M. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP; Rio de Janeiro: Ed. Três, 1994. p.15-50.

BRYANT, N. J., GOVERS, R.; JAMES, D. E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**., v. 3, p. 267–277, 2002.

CARVALHO, E. N.; CARVALHO, N. A. S.; FERREIRA, L. M. Experimental Model of induction of diabetes mellitus in rats. **Acta Cir Bras.**, v. 8, p. 60- 64, 2003.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, vol.46, n.4, p. 419-425, 2002.

CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Quim Nova**, v. 32, p. 1544-1548, 2009.

CHENG, A. Y. Y.; FANTUS, I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, p.213-226, 2005.

CONTRERAS, F.; RIVERA, M.; VÁSQUEZ, J. F.; YÁNEZ, C. J. B.; DE LA PARTE, M. A.; VELASCO, M. Diabetes e Hipertensión Aspectos Clínicos y Terapêuticos. **Archivos Venezolanos Farmacologia y Terapeutica**, v.19, n.1, p. 11-26, 2000.

CROSS, D. A.; AILESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMING, B. A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, p. 785- 789, 1995.

FEITOSA, A. C. R.; MARANHAO, R. C.; FEITOSA FILHO, G. S.; WAJCHENBERG, B. L. Transferência de lípidos para a lipoproteína de alta densidade (HDL) em mulheres com diabetes melito tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.53, n.1, p. 95-101, 2009.

FERREIRA, C. L. R. A; FERREIRA, M. G. Características epidemiológicas de pacientes diabéticos da rede pública de saúde – análise a partir do sistema HiperDia . **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 53, n.1, p 80-86, 2009.

FELFILI, J. M.; SILVA JÚNIOR, M. C. A comparative study of cerrado (*sensu stricto*) vegetation in Central Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 9, p. 277-289, 1993.

FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 22, p. 1237-42, 1999.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J. X.; O'BRIEN, P. J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v.177, p.91-104, 2002.

GOMES, M. B. Glitazonas e Síndrome Metabólica: Mecanismos de Ação, Fisiopatologia e Indicações Terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 50, n.2, p. 271-280, 2006.

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulinlike activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (Coriander). **Brit J Nutr.**, v .81, p. 203-209, 1999.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICHEL, A. J. AZEVEDO, M. J. Diabetes Melito: Diagnostico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 46, n. 1, 2002.

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

JACOBSON, A.M. Current concepts: the psychological care of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal Medicine**, v. 334, 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, p. 171-78, 1997.

JAIN, S. K.; RAINS, J. L.; CROAD, J. L. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 1124-31, 2007.

JENMEY, A.; PROJETTO, J.; O'DEA, K.; NANKERVIS, A.; TRAIANEDES, K.; D'EMBDEN, E. Low-dose acarbose improves glycemic control in NIDDM patients without change in insulin sensitivity. **Diabetes Care**, v. 16, p. 499-502, 1993.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P. Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia puniceifolia* - Myrtaceae). **Acta Amazonica**, v.30, n.1, p.49-57, 2000.

KHAN, B. A.; ABRAHAM, A.; LEELAMMA, S. Hypoglycemic action of *Murray Koenigii* (curry leaf), *Brassica juncea* (mustard); mechanism of action. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 32, p. 106– 8, 1995.

KAHN, C . R. Current concepts of the molecular mechanism of insulin action. **Ann. Rev. Med.**, v. 36, p. 429-451, 1985.

KAHRAMAN, A. ERKASAP, N.; KOKEN, T.; SERTERSER, M. AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic proprieties of quercetin in ethanol-induced gastric lesion. **Toxicology**, v.183, n.3, p.133-142, 2003.

KUMAR, A., ILAVARASAN, R., JAYACHANDRAN, T., DEECARAMAN, M., KUMAR, R. M., ARAVINDAN, P., PADMANABHAN, N., KRISHAN, M. R. V. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini* seed. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.8, p. 941–943, 2008.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. A. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. **Brittonia**, v. 49, n. 4, p. 508 – 536, 1997.

LEHTO, S.; RONNEMAA, T.; HAFFNER, S. M.; PYORALA, K.; KALLIO, V.; LAAKSO, M. Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008.

LERCO, M. M.; SPADELLA, C. T.; MACHADO, J. L. M.; SCHELLINI, S. A.; PADOVANI, C. R. Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes Mellitus*, induzido pela aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n.2, 2003.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

LUCAS, E. J.; HARRIS, A. S.; MAZINE, F. F.; BELSHAM, S. R.; NICLUGHADHA, E. M.; TELFORD, A.; GASSON, P. E.; CHASE, M. W. Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales). **Taxon**, v. 56, p. 1105–1128, 2007.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The pharmacological evaluation of natura products - General and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **J Ethnopharmacol.**, v. 8, p 127-147, 1983.

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

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; UEDA, H.; YOSHIKAWA, M. Aldose reductase and new triterpene and Its oligoglycoside, centellasapogenol A and centellasaponina, from *Centela asiatica* (gotu kola). **Heterocycles**, v. 55, p. 1499-1504, 2001.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 7, p. 1301-1308, 2002.

MAY, M. E.; BUSE, M. G. Effects of branched-chain amino acids on protein turnover. **Diabetes Metabolism Res.**, v.5, n.3, p.227-245, 1989.

MCLELLAN, K. C. P.; BARBALHO, S. M.; CATTALINI, M.; LERARIO, A. C. *Diabetes mellitus* do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. **Rev. Nutr.**, v.20, n.5, p. 515-524, 2007.

MENEZES, F. S.; MINTO, A. B. M.; RUELA, H. S.; KUSTER, R. M.; SHERIDAN, H.; FRANKISH, N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz.. **Rev. bras. Farmacogn.**, v. 17, n.1, p. 8-13, 2007.

MITRA, S.K.; GOPUMADHAVAN, S.; MURALIDHAR, T. S.; ANTURLIKAR, S. D.; SUJATHA, M. B. Effect of D-400, a herbomineral preparation on lipid profile, glycated haemoglobin and glucose tolerance in streptozotocin induced diabetes in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 33, p. 798–800, 1995.

MIURA, T., MIZUTANI, Y., ISHIDA, T. Antidiabetic effect of the herb *Myrcia speciosa* in KK-Ay diabetic mice. **J. Trad. Med.**, v. 23, p. 16-18, 2006.

MIYAKE, Y.; YAMAMOTO, K.; TSUJIHARA, N. Protective effects of lemon flavonoids on oxidative stress in diabetic rats. **Lipids**, v.33, p.689-695, 1998.

MORI, S. A.; BOOM, B. M.; CARVALINO, A. M.; SANTOS, T. S. Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, v. 1, p. 68-70, 1983.

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

OLIVEIRA FILHO A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of floristic differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the influence of climate. **Biotropica**, v. 32, p. 793-810, 2000.

PEPATO, M. T.; OLIVEIRA, J. R.; KETTELHUT, I. C.; MIGLIORINI, R. H. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Diabetes Research**, v. 22, p. 49-57, 1993.

PILKS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Ann Rev Physiol.**, v.54. p. 885-909.1992.

RAFACHO, A.; ROMA, L. P., TABOGA, S. R.; BOSCHERO, A. C.; BOSQUEIRO, J. R. , Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 85 , p. 536–545, 2007.

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

SANTOS, R. F.; NORMIZO, R.; WAJCHENBERG, B. L.; REAVEN, G.; AZHAR, S. Changes in insulin receptor tyrosine kinase activity associated with metformin treatment of type 2 diabetes. **Diabetes Metabol.**, v. 21, p. 274-280, 1995.

SEGAL, P. Efficacy and safety of miglitol therapy compared with glibenclamide in patients with NIDDM inadequately controlled by diet. **Diabetes Care**, v. 20, p. 687 - 691, 1997.

SHEPHERD, P. R.; WITHERS, D. J.; SIDDLE, K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. **Biochem J.**, v.333, p. 471–490, 1998.

SILVA, M. M.; SANTOS, M. R.; CAROÇO, G.; ROCHA, R.; JUSTINO, G.; MIRA, L. et al. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids: a re-examination. **Free Radic. Res.**, v.36, n.11, p.1219-1227, 2002.

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

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 5, p. 329 – 337, 2007.

STEINER, D. F.; CHAN, S. J.; WELSH, J. M.; KWOW, S.C.M. Structure and evolution of the insulin gene. **Ann. Rev. Genet.**, v. 19, p. 463-484, 1985.

SUTHERLAND, C., O'BRIEN, R. M., GRANNER, D. K. New connections in the regulation of PEPCCK gene expression by insulin. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 351p. 191 1999. 1996.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res.**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TANIRA, M.O.M. Antidiabetic medicinal plants: a review of the present status and future directions. **Int. J. Diabetes.**, v.2, n.1, p. 15-22. 1994.

WANG, C. C.; TSOU, C. L. The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule. **TIBS**. v.16, p. 279-281, 1991.

WHITE, M. F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. **Mol Cell Biochem.**, v.182, p. 3-11, 1998.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of intrafamilial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, p.2013– 2025, 2001.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p.3-19, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO consultation. Geneva, **World Health Organization**, 1999.

YADAV, U. C.; MOORTHY, K.; BAQUER, N. C. Combined treatment of sodium orthovanadate and *Mormodica charantia* fruit extract prevents alterations in lipid profile and lipogenic enzymes in alloxan diabetic rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 268, n. 1, p. 111–20, 2005.

YOSHIKAWA, M.; MATSUDA, H.; NISHIDA, N. Antidiabetic principles of natural medicines. V.1) Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 50, n. 3, p. 429-431, 2002.

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

9. Anexos

9.1 - Anexo 1

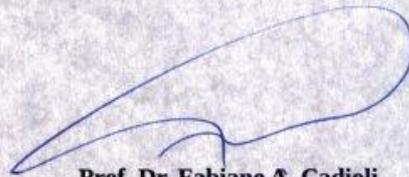
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “**Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de Myrcia bella em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina**” sob responsabilidade do Pesquisador **JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO** e colaboração de Priscilla Maria Ponce Vareda está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **01741-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research “**Hypoglycemic effect of Myrcia bella extract in streptozotocin-induced diabetic mice**”, process number **01741-2012**, under responsibility of **JOSÉ ROBERTO BOSQUEIRO** and with collaboration of Priscilla Maria Ponce Vareda agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator

9.2 – Anexo 2

Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental

Myrcia bella – 2000mg/Kg

| Sintomas | Normal | Tempo e data | | | | | |
|-------------------|--------|--------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| | | | 30 minutos | 60 minutos | 120 minutos | 240 minutos | 360 minutos |
| Aparência geral | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Frênto vocal | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Irritabilidade | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Reposta ao toque | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Aperto da cauda | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Contorção | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Trem posterior | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Endireitamento | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Tônus muscular | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Força de agarrar | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Ataxia | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Reflexo auricular | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Reflexo corneal | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Tremores | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Convulsões | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Estimulações | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Straub | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hipnose | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Anestesia | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Lacrimação | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ptose | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Micção | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Piloereção | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Defecação | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Hipotermia | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Respiração | 4 | | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Cianose | 0 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Morte | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.