

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação de Mestrado

**Investigação do papel protetor de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum*
sobre alterações metabólicas e oxidativas em modelo animal de resistência
à insulina**

Juliane de Souza Cardoso

Pelotas, 2017

Juliane de Souza Cardoso

**Investigação do papel protetor de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum*
sobre alterações metabólicas e oxidativas em modelo animal de resistência
à insulina**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello Co-
orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares

Pelotas, 2017

Juliane de Souza Cardoso

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C268i Cardoso, Juliane

Investigação do papel protetor de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* sobre alterações metabólicas e oxidativas em modelo animal de resistência à insulina / Juliane Cardoso ; Francieli Moro Stefanello, orientadora ; Rejane Giacomelli Tavares, coorientadora. — Pelotas, 2017.
63 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Resistência à insulina. 2. Estresse oxidativo. 3. Dexametasona. 4. *Eugenia uniflora*. 5. *Psidium cattleianum*.
I. Stefanello, Francieli Moro, orient. II. Tavares, Rejane Giacomelli, coorient. III. Título.
CDD : 574.192

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Juliane de Souza Cardoso

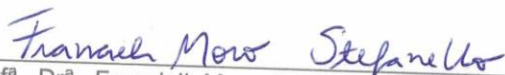
Juliane de Souza Cardoso

Investigação do papel protetor de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* sobre alterações metabólicas e oxidativas em modelo animal de resistência à insulina

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção), Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 02 de março de 2017

Banca examinadora:



Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello (Orientadora)
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS



Prof^a. Dr^a. Roselia Maria Spanevello
Doutora em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela UFRGS



Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela UFPel

Agradecimentos

A Deus pela oportunidade do estudo, por guiar meus passos e me dar força para nunca desistir dos meus objetivos.

Aos meus pais, exemplos de caráter e dignidade, que através do amor incondicional a mim dado fazem com que eu siga em busca de um futuro melhor. Sem eles nada teria sentido.

Ao meu noivo por “segurar a barra”, muitas vezes sozinho, não permitindo que eu desistisse de ir até o final.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello por ter me aceitado como sua orientada, pelos grandes conhecimentos transmitidos, dedicação, inspiração e carinho durante a elaboração deste trabalho.

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Rejane Giacomelli Tavares pelos ensinamentos compartilhados e contribuições a este trabalho.

A Dr^a. Flávia Aleixo Vasconcelos pela ajuda incansável durante etapas importantes deste trabalho, sempre com muita disposição e carinho.

A doutoranda Pathise Souto Oliveira, que me recebeu de braços abertos e me ensinou tudo o que hoje sei no laboratório, tornando-se mais que uma colega de trabalho, uma grande amiga, a qual serei eternamente grata.

A todos os professores que contribuíram para meu aprendizado durante esta caminhada.

Aos colegas de aula e alunos dos laboratórios Biomarcadores e Neurocan que partilharam comigo etapas importantes de aprendizado e contribuíram para a execução deste trabalho, especialmente a colega de mestrado Natália Porto que muito me ensinou no laboratório, e as alunas de iniciação científica Pâmela Gonçalves, Natália Bona e Tiane Rodrigues. Obrigada pela agradável companhia, momentos de conversas e risadas e principalmente por toda ajuda.

As minhas amigas que sempre me deram força para não desistir, me lembrando que esse era o melhor caminho e que apesar das dificuldades iria valer à pena, em especial a Paula Victoria, Juliana Pegoraro, Marcelene Duarte, Thaís Nunes e Marília Souza.

Agradeço aos auxílios financeiros recebidos para a execução deste trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
(CHARLES CHAPLIN)

Resumo

CARDOSO, Juliane de Souza. **Investigação do papel protetor de *Eugenia uniflora* e *Psidium cattleianum* sobre alterações metabólicas e oxidativas em modelo animal de resistência à insulina.** 2017. 63f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A resistência à insulina (RI) desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversas patologias, como diabetes mellitus, hipertensão, dislipidemia, doenças cardiovasculares, entre outras. Estudos revelam efeitos benéficos de plantas ricas em compostos fenólicos no tratamento de doenças, como o diabetes mellitus, principalmente por sua atividade antioxidante. Diante disto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do consumo de extratos de frutos nativos do Brasil (*Eugenia uniflora* – pitanga e *Psidium cattleianum* – araçá) sobre ganho de peso corporal e peso pancreático, parâmetros bioquímicos séricos e marcadores de dano oxidativo em fígado de animais submetidos ao modelo de RI induzida por dexametasona (DEX). Ratos Wistar machos receberam água, extrato de *E. uniflora* (200 mg/Kg) ou de *P. cattleianum* (200 mg/Kg) uma vez ao dia por gavagem durante 21 dias. Nos últimos 5 dias, os animais receberam uma injeção intraperitoneal diária de salina ou DEX (1 mg/Kg). Os resultados deste estudo demonstraram que a administração de DEX reduziu o ganho de peso corporal e o peso pancreático relativo, bem como ocasionou intolerância à glicose e aumentou os níveis séricos de glicose e de triacilgliceróis. Os extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* foram capazes de prevenir a hiperglicemia e a hipertrigliceridemia induzidas pela DEX. Em relação aos marcadores de estresse oxidativo avaliados em fígado, foi demonstrado que a administração de DEX aumentou os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de espécies reativas de oxigênio e ambos os extratos preveniram estas alterações. Adicionalmente, foi observada uma redução na atividade da enzima glutationa peroxidase no grupo tratado com DEX. No entanto, não houve diferença significativa em relação ao conteúdo tiólico total e nas atividades das enzimas catalase, superóxido dismutase e delta-aminolevulinato desidratase em todos os grupos testados. Desta forma, pode-se concluir que os extratos de pitanga e araçá possuem importantes atividades antihiperglicêmica, antidislipidêmica e antioxidante, podendo ser úteis no manejo terapêutico de alterações decorrentes da RI.

Palavras-chave: Resistência à insulina; Estresse oxidativo; Dexametasona; *Eugenia uniflora*; *Psidium cattleianum*; Modelo animal

Abstract

CARDOSO, Juliane Souza. **Investigation of the protective role of *Eugenia uniflora* and *Psidium cattleianum* on metabolic and oxidative changes in animal model of insulin resistance.** 2017. 63f. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The insulin resistance (IR) plays an important role in the development of various diseases, such as diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular diseases. Studies show beneficial effects of plants rich in phenolic compounds in the treatment of diseases as diabetes mellitus, mainly by the antioxidant activity of these compounds. So, the aim of the present study was to evaluate the effects of the Brazilian native fruit (*Eugenia uniflora* and *Psidium cattleianum*) extracts on body weight gain and pancreatic weight, serum biochemical parameters as well as on hepatic oxidative markers in an animal model of insulin resistance induced by dexamethasone (DEX). Wistar rats were received water, *E. uniflora* extract (200 mg/Kg) or *P. cattleianum* extract (200 mg/Kg), once a day by gavage for 21 days. In the last 5 days, the animals received an intraperitoneal injection of saline or DEX (1 mg/Kg). Our results demonstrated that DEX caused a reduction in body weight gain and relative pancreatic weight, as well as glucose intolerance, and an increase in serum glucose and triacylglycerols levels. The extracts were able to prevent the hyperglycemia and hypertriglyceridemia induced by DEX. With regard to hepatic oxidative stress parameters, DEX caused an increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances and reactive oxygen species production and both extracts prevented these changes. Besides, GPx activity was reduced by DEX. However, total thiol content and activities of the catalase, superoxide dismutase and delta-aminolevulinate dehydratase were not altered in any of the tested groups. Thus, extracts of *Eugenia uniflora* and *Psidium cattleianum* elicited important antihyperglycemic, antidyslipidemic and antioxidant effects, and may be useful in the therapeutic management of alterations due to IR.

Keywords: Insulin resistance; Redox status; *Eugenia uniflora*; *Psidium cattleianum*; Animal model

Lista de Figuras

Figura 1	Hiperglicemia causada pela resistência à insulina.....	17
Figura 2	Via de sinalização da insulina.....	19
Figura 3	Mecanismos de indução da resistência á insulina pelos ácidos graxos livres.....	20
Figura 4	Fontes endógenas e exógenas de espécies reativas de oxigênio.....	25
Figura 5	Relação do estresse oxidativo e resistência à insulina.....	27
Figura 6	Pitanga (<i>Eugenia uniflora</i>).....	29
Figura 7	Araçá (<i>Psidium cattleianum</i>).....	30

Lista de Abreviaturas

AGE	Produtos finais de glicação avançada
AGL	Ácidos graxos livres
AKT	Proteína cinase B
CAT	Catalase
DCV	Doenças cardiovasculares
DEX	Dexametasona
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP-4	Dipeptidil peptidase 4
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GLUT4	Transportador de glicose 4
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HO•	Radical hidroxila
i.p.	Intraperitoneal
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
InR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
PCR	Proteína C reativa
PDK	Proteína cinase dependente de fosfoinositideo
PI3K	Fosfoinositideo-3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato
RI	Resistência à insulina
Ser	Serina

SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido dismutase
TA	Tecido adiposo
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TAG	Triacilglicerol
TTG	Teste de tolerância à glicose
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
δ -ALA-D	Delta-aminolevulinato desidratase

Sumário

1 Introdução	13
2 Objetivos.	15
Objetivo Geral.....	15
Objetivos Específicos.	15
3 Revisão da Literatura.....	16
Resistência à Insulina.....	16
Modelos Animais de Resistência à Insulina	23
Resistência à Insulina e Estresse Oxidativo.....	25
Resistência à Insulina e Produtos Naturais.....	27
 Manuscrito	 32
 4 Conclusão.....	 53
Referências	54
Anexo	62

PARTE II

1 Introdução

A resistência à insulina (RI) resulta de alterações em vários níveis da via de sinalização da insulina que causam a ineficiente ação deste hormônio, como resultado a glicose não consegue ser captada pelas células causando hiperglicemia. Logo, a RI é o principal fator desencadeante da diabetes mellitus (DM), um transtorno metabólico complexo e heterogêneo responsável por alta morbidade e mortalidade decorrente de alterações macro e microvasculares (ALTAF et al., 2014). É considerada uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países e o aumento na sua prevalência está relacionado ao estilo de vida atual, caracterizado pela inatividade física e inadequado hábito alimentar, que leva à obesidade, principal causa de RI (WRITING et al., 2011).

Dados da literatura sugerem que a obesidade está relacionada ao desenvolvimento de RI por vários mecanismos, que incluem principalmente o aumento das concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres (AGL), de citocinas pró-inflamatórias e no aumento do estresse oxidativo (BODEN et al., 2015). Os AGL em excesso, além de causar dislipidemia, podendo levar ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares (DCV), são oxidados, e os metabólitos desta oxidação causam alterações em importantes etapas da via de sinalização da insulina, iniciando pela inativação do substrato de receptor de insulina (IRS), prejudicando assim, a captação da glicose pela célula (LAAKSO, 2015; TINKOV et al., 2015). Ainda, o tecido adiposo em obesos encontra-se em um processo inflamatório constante, que gera grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) (TANGVARASITTICHAJ et al., 2016).

A RI também é responsável pelo surgimento de diversas outras patologias, como hipertensão, dislipidemia e DCV, que em conjunto caracterizam a síndrome metabólica (SM), um problema de saúde pública responsável por altas taxas de mortalidade devido a complicações macrovasculares, doença renal, retinopatia, neuropatia e diversos tipos de câncer (POP et al., 2015; MICUCCI et al., 2016). A relação da RI com os outros fatores que compõem a SM pode ser explicada pelo aumento do estresse oxidativo provocado pela RI, pois a hiperglicemia resultante da RI provoca um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e alteração na defesa antioxidante do organismo, agravando o dano oxidativo às

células. E este, por sua vez, provoca disfunção endotelial, que causa hipertensão arterial e é considerado um marcador precoce de DCV, pois desencadeia o processo aterosclerótico (PATEL et al., 2016; SITI et al., 2015).

Diversas plantas são utilizadas na medicina popular como hipoglicemiantes e seus constituintes são isolados para melhor compreensão do mecanismo de ação destes na RI associada ao DM. Dentre os componentes destacam-se os flavonoides, terpenoides, carboidratos, peptídeos e aminoácidos, os quais podem atuar na inibição da absorção de glicose, melhora da sensibilidade à insulina, proteção contra danos às células β pancreáticas, aumento da secreção de insulina e da defesa antioxidante, redução da inflamação, regulação do metabolismo dos carboidratos e da via de sinalização da insulina (EDDOUKS et al., 2014).

Estudos utilizando modelos animais de RI induzida por dieta rica em gordura ou pelo uso de fármacos que causam RI, como os corticoides, permitem avaliar os efeitos de diferentes plantas nesta doença (MARY et al., 2012; SANKAR et al., 2015). O uso de vegetais ricos em polifenóis tem sido associado ao menor risco de DM, câncer, DCV e distúrbios neurológicos (DA CUNHA et al., 2016). Neste contexto, a pitanga (*Eugenia uniflora*) e araçá (*Psidium cattleianum*), que são plantas pertencentes à família *Myrtaceae* ricas em compostos fenólicos com importante atividade antioxidante, podem ser potenciais agentes de tratamento ou prevenção da RI e, por conseguinte da DM (CASTRO et al., 2014; DA CUNHA et al., 2016).

2 Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos de frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* sobre parâmetros metabólicos e de estresse oxidativo em modelo animal de resistência à insulina (RI) induzida por dexametasona (DEX).

Objetivos Específicos

- Avaliar *in vivo* o efeito dos extratos de frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* no ganho de peso corporal, peso pancreático e na prevenção da hiperglicemia e dislipidemia causadas pela administração de DEX.
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* em fígado de animais submetidos ao modelo de RI, através da determinação de parâmetros como a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo tiólico total e atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e delta-aminolevulinato desidratase (ALA-D).

3 Revisão da Literatura

Resistência à Insulina

A RI é caracterizada por ineficiência na ação da insulina nos tecidos responsivos a este hormônio, como músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, não permitindo a entrada de glicose na célula, o que resulta em hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória, dentre outras consequências (Figura 1) (LAAKSO, 2015). É importante salientar que a RI possui um importante papel no surgimento da hipertensão e da DM, logo a estimativa de indivíduos com RI poderá prever a incidência de DM tanto em população normal quanto em pré-hipertensos (SUNG et al., 2016).

A DM é classificada em duas principais categorias, a diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Na DM1, também chamada de diabetes insulino dependente, há uma deficiência absoluta de insulina, devido a uma destruição progressiva das células β pancreáticas e geralmente surge na infância ou adolescência com hiperglicemia grave e cetoacidose, que indicam a necessidade de insulina exógena. A DM2 representa 90-95% de todos os casos de diabetes, sendo caracterizada por algum grau de comprometimento na secreção de insulina e resistência à sua ação, e quase todos estes pacientes no momento do diagnóstico possuem sobrepeso ou obesidade, inatividade física, hipertensão e dislipidemia. É uma doença mais prevalente em adultos, porém já há uma grande incidência em crianças e jovens, que refletem taxas crescentes de obesidade infantil (KARALLIEDDE & GNUDI, 2016).

Atualmente, estima-se que há 387 milhões de pessoas com DM no mundo e 11,9 milhões no Brasil, e que em 2035 esta população aumente para 471 e 19,2 milhões, respectivamente (MILECH et al., 2016). A esta epidemia de DM atribui-se o estilo de vida atual, onde há um consumo excessivo de alimentos ricos em gordura e menor atividade física, que levam à dislipidemia, obesidade e RI. O tecido adiposo (TA) subcutâneo possui certa capacidade de armazenamento, determinada geneticamente ou modificada por estilo de vida na pré-puberdade, e quando esgotada, o lipídeo passa a ser armazenado em outros depósitos mais prejudiciais, como TA visceral, fígado e miocárdio (GUSTAFSON et al., 2015).

Desta forma, a obesidade, que é definida como índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30 Kg/m², não é um marcador individual sensível para as complicações metabólicas relacionadas a esta doença. Logo, a medida da distribuição de TA abdominal (visceral), verificada através da circunferência da cintura (CC) é importante, pois CC elevada aumenta consideravelmente o risco para DM (BONNEAU et al., 2014; GUSTAFSON et al., 2015) e DCV (ADEGBIJA et al., 2015).

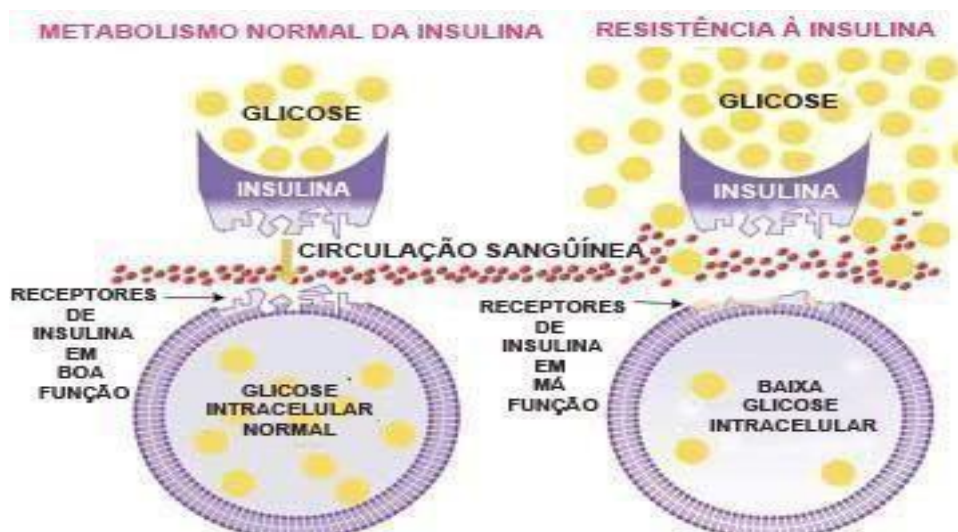


Figura 1: Ilustração da hiperglicemia causada pela resistência à insulina (<http://www.menosrotulos.com.br/2016/06/um-novo-paradigma-da-resistencia.html>)

DM, obesidade, dislipidemia, hipertensão e RI constituem um conjunto de fatores que caracterizam a SM, (descrita por muito tempo como síndrome da resistência à insulina e síndrome X) (NORRIS & RICH, 2012) a qual está associada a complicações macrovasculares, doença renal, retinopatia, neuropatia e maior mortalidade (POP et al., 2015). A SM é um problema de saúde pública que aumenta em duas vezes a chance de desenvolver DCV (angina, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio) em cinco a dez anos, e aumenta em cinco vezes o risco de DM, além de aumentar os casos de diversos tipos de câncer (MICUCCI et al., 2016). As DCV estão em primeiro lugar entre as dez principais causas de morte no mundo e em 2012, elas levaram a óbito 17,5 milhões de pessoas (WHO, 2012). No Brasil, 72,6% do total de óbitos registrados foram devido às doenças crônicas não transmissíveis: DCV, neoplasias, doenças respiratórias crônicas e DM (OMS,

2014). É importante ressaltar que a RI é considerada o principal fator encontrado na SM e desencadeador dos demais fatores, visto que a RI promove uma anormalidade no metabolismo de carboidratos e lipídeos (ROBERTS et al., 2014).

A insulina pertence à superfamília de hormônios peptídicos secretados em vertebrados pelas células β das ilhotas pancreáticas de Langerhans em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose. Ela regula a homeostase de glicose de diversas maneiras: diminuindo a gliconeogênese e a glicogenólise e aumentando a captação de glicose pelos tecidos periféricos, principalmente músculo e TA. Além disto, a insulina regula o metabolismo de lipídeos e proteínas, estimulando a lipogênese e reduzindo a lipólise e ainda, aumentando a síntese e inibindo a degradação proteica (CARVALHEIRA et al., 2012; XU et al., 2014).

A captação de glicose pelas células resulta de inúmeras ações realizadas por componentes da via de sinalização da insulina, como os substratos do receptor de insulina 1/2 (IRS-1 e IRS-2), fosfoinositídeo-3-cinase (PI3K), proteína cinase B (PKB), também conhecida como AKT e o transportador de glicose 4 (GLUT4) (DIONÍSIO et al., 2014). A via de sinalização da insulina consiste em uma cascata de reações iniciada primeiramente pela ação da insulina sobre a enzima tirosina, que se auto fosforila e ativa o receptor de insulina (InR), que, por sua vez, transmite um sinal através do IRS1/2 resultando na ativação da PI3K. A PI3K catalisa a fosforilação da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2) à fosfatidilinositol-3,4,5- trisfosfato (PIP3), que em níveis aumentados levam ao recrutamento da proteína cinase dependente de fosfoinositídeo (PDK) e AKT do citosol para a superfície celular, acompanhado por fosforilação e ativação de AKT (Figura 2) (VAN DAM et al., 2005; XU et al., 2014).

O passo limitante do transporte da glicose é realizado pelo GLUT4, um transportador pertencente à família de glicoproteínas de membrana que responde à insulina e é altamente expresso no músculo esquelético, músculo cardíaco, TA branco e marrom (KRAFT et al., 2015). Este passo, chamado translocação do GLUT4, ainda não é bem elucidado, porém evidências consideráveis apontam para a relação da AKT e seu substrato, a proteína AS160, com a exocitose de vesículas especializadas contendo GLUT4 para a

superfície celular (ZEIGERER et al., 2004). O transportador de glicose GLUT4 é o principal removedor da glicose circulante e regulador chave da homeostase da glicose do corpo inteiro (HUANG & CZECH, 2007), assim o aumento na sua expressão e função pode ser um importante alvo para a melhora da sensibilidade à insulina (GURLEY et al., 2016).

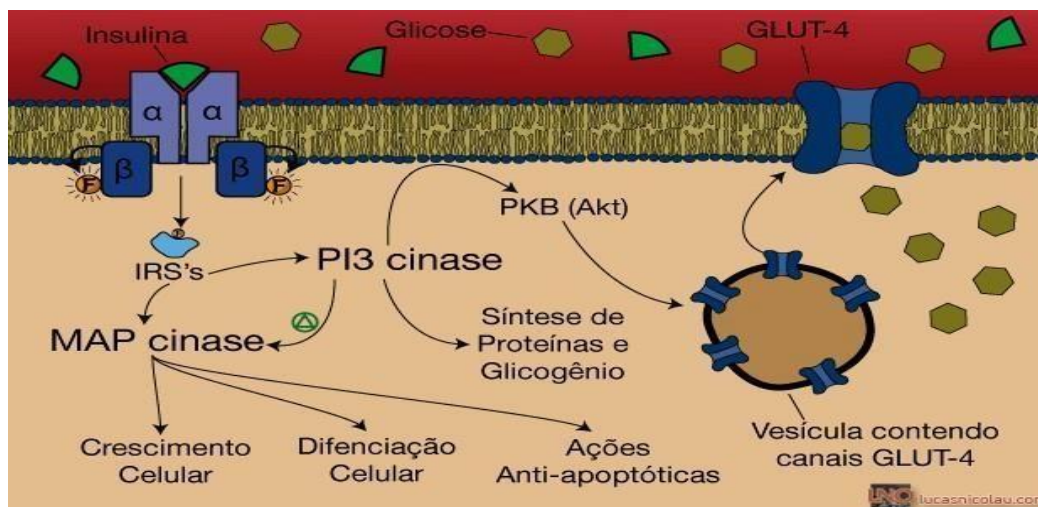


Figura 2: Via de sinalização da insulina (<http://lucasnicolau.com/?v=publicacoes&id=10>)

RI resulta de diversos fatores que alteram a utilização da glicose, e neste contexto, a obesidade vem sendo relatada por diversos autores como a principal causa e a responsável pelo surgimento das demais. Ainda em estudo, acredita-se que a relação da obesidade com a RI está no aumento das concentrações plasmáticas de AGL e de citocinas pró-inflamatórias, no aumento do estresse reticular endoplasmático no fígado e no TA, e no aumento do estresse oxidativo (BODEN et al., 2015).

O TA em obesos é caracterizado por uma grande liberação e oxidação de AGL, que aumenta os níveis celulares de diacilglicerol, acetil-CoA e ceramida. O diacilglicerol e a ceramida fosforilam o IRS em serina (Ser), mais especificamente Ser302 e Ser307, locais que afetam negativamente IRS, tornando-o incapaz de ativar a PI3K, prejudicando assim a via de sinalização da insulina (TINKOV et al., 2015). Além disto, há um maior influxo de AGL para o fígado o que estimula a produção de triacilgliceróis (TAG), lipoproteínas como a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminui os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL), caracterizando uma dislipidemia que poderá levar a aterosclerose e DCV (LAAKSO et al., 2015; PATEL et al.,

2016) (Figura 3).

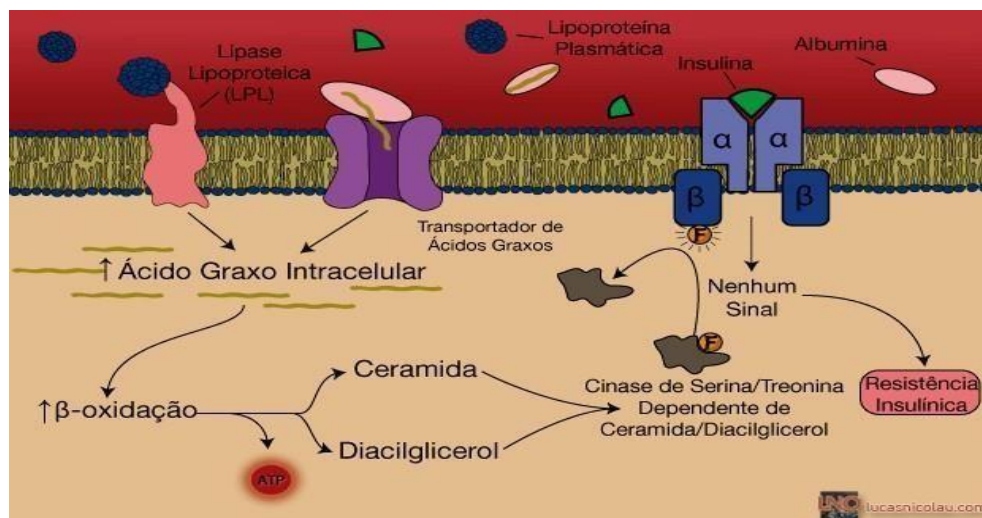


Figura 3: Mecanismos de indução da RI pelos AGL (<http://lucasnicolau.com/?v=publicacoes&id=10>)

Durante o ganho de peso há uma expansão do TA que levam à inflamação local e até mesmo apoptose dos adipócitos já existentes (LAAKSO et al., 2015). Os macrófagos se acumulam no TA em proporção ao IMC e ao tamanho das células adiposas e secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6, que, por sua vez, provocam a migração de macrófagos para o TA aumentando ainda mais a liberação de citocinas, caracterizando uma inflamação crônica do TA. O aumento destes mediadores acarreta a produção de PCR pelo fígado, leucócitos e TA, sendo assim, níveis de TNF- α , IL-6 e de PCR são utilizados para avaliar a inflamação sistêmica e verificar a relação desta com a RI (TANGVARASITTICHA et al., 2016). Esta relação é de extrema importância, pois a produção de mediadores inflamatórios causam efeitos deletérios na homeostase da glicose e na função das células β pancreáticas (GONULLO et al., 2005) e pode levar à doença hepática gordurosa não-alcoólica (LAAKSO et al., 2015).

Dentro do microambiente do TA, os adipócitos secretam adipocinas, incluindo leptina, adiponectina e resistina para regular o metabolismo sistêmico de lipídios e glicose. A leptina, um hormônio produto do gene obeso (*ob*) secretado principalmente pelo TA branco, controla o peso corporal, diminuindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético. Evidências sugerem que ela melhora a sensibilidade à insulina (CARRASCOSA et al., 2011). Indivíduos

obesos possuem cerca de cinco vezes mais quantidade de leptina que indivíduos magros e esta hiperleptinemia é atribuída a alterações no receptor de leptina ou uma deficiência no seu transporte pela barreira hemato-encefálica, este fenômeno denomina-se resistência à leptina, semelhante à resistência à insulina (ROMERO & ZANESCO, 2006). Portanto, apesar dos efeitos benéficos da leptina na sensibilidade à insulina, a resistência ao seu excesso torna-se prejudicial, e a alta concentração de leptina acaba por inibir a captação de glicose estimulada pela insulina (CARRASCOSA et al., 2011).

A adiponectina, ao contrário da leptina, tem sua secreção diminuída com o aumento do TA. Em situações de menor massa gorda, ela diminui a fosforilação em serina de IRS-1, favorecendo a fosforilação em tirosina e aumentando a captação de glicose e no hipotálamo ela estimula o apetite e diminui o gasto energético (CARRASCOSA et al., 2011). Com a obesidade há uma diminuição nos seus níveis, a hipoadiponectinemia, que está relacionada à disfunção endotelial e RI. ZHAO e colaboradores (2015) mostraram que a administração de adiponectina restaurou a função endotelial e melhorou a sensibilidade à insulina em animais alimentados com alto teor de gordura, mostrando que este hormônio poderá ser um potencial terapêutico para a melhora da RI e prevenção das complicações associadas ao DM.

A resistina é um hormônio secretado principalmente pelo TA visceral que prejudica a ação da insulina em diferentes tecidos, como fígado, músculo e TA. O efeito da resistina na inibição da ação da insulina provavelmente é mediado por via inflamatória, pois ela estimula a secreção de TNF- α e IL-6 (CARRASCOSA et al., 2011).

Outro fator fisiológico comum para o surgimento da RI é o envelhecimento, tendo sido demonstrado em ratos idosos uma alteração nos passos iniciais da via de sinalização da insulina, e consequentemente uma redução na sensibilidade à sua ação, principalmente no TA. Mais especificamente, alterações na distribuição e fosforilação de IRS-1 e IRS-3 encontradas em adipócitos de ratos idosos resistentes à insulina podem contribuir para uma menor ativação de AKT e menor translocação de GLUT4 (VILLAR et al., 2006). Esta redução na sensibilidade à insulina ocasionada pelo envelhecimento também já está bem estabelecida em humanos, porém as causas que levam a este quadro seguem sendo investigadas (LONNROTH & SMITH, 1986; CARRASCOSA et al., 2011).

O tratamento da DM consiste na prevenção das consequências causadas pela RI, como hipertensão, dislipidemias, DCV, entre outras. Como visto até aqui, a obesidade é o principal contribuinte para o surgimento da RI por diversos mecanismos, como o acúmulo de gordura ectópica no fígado e músculo, a liberação de AGL, aumento da inflamação e alterações na secreção de adipocinas. Assim, mudanças no estilo de vida, através de uma alimentação mais saudável e inserção da prática de atividade física, visando à perda de peso, devem ser adotadas para a melhora da sensibilidade à insulina e controle da DM (ALTAF et al., 2014).

Além das mudanças no estilo de vida, existem diversas opções farmacológicas para perder peso, como sibutramina, orlistate, fentermina, dietilpropiona (também conhecida como anfepramona) e bupropiona (HASANI-RANJBAR et al., 2009). A sibutramina age no sistema nervoso central através da inibição da recaptação de serotonina e noradrenalina, levando ao aumento do gasto energético e diminuição da ingestão alimentar. Seu uso indevido pode causar efeitos colaterais no sistema cardiovascular e na reprodução masculina.

Com isso, em 2010 este fármaco foi retirado do mercado europeu e norte-americano (DE SOUZA et al., 2014), porém no Brasil, apesar de já proibidas diversas vezes, sua fabricação e comercialização estão atualmente liberadas (ANVISA, 2016). O orlistate é um medicamento utilizado em associação a mudanças no estilo de vida para a redução de peso, ele age reduzindo a absorção de gordura, através da inibição da enzima lipase (ALDEKHAIL et al., 2015). Geralmente seu uso é bem tolerado, porém como efeitos colaterais podem ocorrer dispepsia (má digestão), incontinência fecal, esteatorreia, lesão renal e hepática (SALL et al., 2014). Fentermina e dietilpropiona estão entre os supressores de apetite mais utilizados, e a bupropiona, um análogo de dietilpropiona também promove a redução de peso. Os supressores de apetite modulam as concentrações de hormônios como a serotonina, norepinefrina e dopamina, aumentando a saciedade e o gasto energético (KALYANASUNDAR et al., 2015).

Ainda, como tratamento da DM, os principais fármacos utilizados são metformina, sulfonilureias, tiazolidinedionas, inibidores da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), agonistas do receptor do peptídeo 1 tipo glucagon, entre outros (KANEKO & NARUKAVA, 2016). A metformina é um dos agentes antidiabéticos mais comumente utilizado para o tratamento da RI em pacientes com DM. Ela

diminui a síntese hepática de glicose, o que leva à diminuição da concentração de glicose no sangue, melhora da sensibilidade à insulina e consequentemente, à redução da hiperinsulinemia. Além disto, como consequência, a metformina diminui os TG plasmáticos, LDL e os AGL e aumenta os níveis de HDL (FONSECA, 2010).

A Associação Americana de Diabetes recomendou em 2015, que o tratamento de DM deve iniciar com metformina em monoterapia e quando não eficaz, deve haver associação de metformina com sulfonilureias ou com um inibidor da DPP-4. Os inibidores da DPP-4 são medicamentos relativamente novos e incluem a sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina e linagliptina (CHEN et al., 2016). Eles inibem a enzima DPP-4, responsável pela degradação do peptídeo semelhante ao glucagon, um hormônio benéfico para a homeostase da glicose que potencializa a ação da insulina e suprime a secreção de glucagon (DEACON & LEOVITZ, 2016). As sulfonilureias, como a glibenclamida e a glimepirida, são medicamentos eficazes e de baixo custo, porém, com efeitos colaterais como hipoglicemia e ganho de peso. Além disto, ERIKSSON e colaboradores (2016) ao avaliar os efeitos da associação de metformina com sulfonilureia e metformina com um inibidor da DPP-4 em pacientes com DM mostraram que os pacientes que foram tratados com a primeira associação tiveram um risco aumentado de hipoglicemia grave, eventos cardiovasculares e mortalidade por todas as causas em comparação com pacientes tratados com metformina e inibidores da DPP-4.

3.1.1 Modelos Animais de Resistência à Insulina

Existem diversos modelos animais para o estudo da homeostase da glicose e vários mecanismos para a indução de desordens metabólicas, e neste contexto, camundongos e ratos são as duas espécies mais utilizadas. No entanto, o rato apresenta como principal vantagem seu tamanho que possibilita a retirada de volume maior de sangue para análises mais frequentes e detalhadas (BOWE et al., 2014). Para a indução de DM em modelos animais comumente utiliza-se estreptozotocina em dose única, através de injeção intraperitoneal (i.p.) (MOHSENFAR et al., 2014) ou dieta rica em gordura associada a administração i.p. de estreptozotocina (YU et al., 2014) e para a indução da RI pesquisadores têm utilizado injeção i.p. de dexametasona (DEX).

DEX é um glicocorticóide altamente utilizado para o tratamento de alergias, asma, dermatites, algumas desordens cerebrais e alguns tipos de câncer, entre outras enfermidades (CUMMINGS et al., 2013; BIGHETTI et al., 2014), porém o uso excessivo deste medicamento está associado à diminuição da sensibilidade à insulina, reduzindo assim a captação e utilização da glicose pelas células (PANDEY et al., 2014). É possível observar em ratos após o uso de glicocorticóides: redução de peso e de massa muscular, alterações nos perfis proteico e lipídico e hiperglicemia. Esta hiperglicemia pode ser explicada pela resistência periférica à insulina e diminuição na secreção deste hormônio pelas células β pancreáticas, afetadas pelo estresse oxidativo provocado pela DEX (MARTÍNEZ et al., 2016).

A insulina e os glicocorticoides possuem efeitos antagonistas em diversas funções cerebrais, incluindo a regulação hipotalâmica do apetite, sendo assim, foi estabelecido o uso de DEX em roedores para analisar a fisiopatologia da RI periférica (CHRUUVATTIL et al., 2016). BIGHETTI e colaboradores (2014) demonstraram que a administração de 1 mg/Kg por via i.p. de DEX por dez dias consecutivos induziu a RI mesmo com o aumento da secreção de insulina, a chamada hiperinsulinemia compensatória. Esta redução na sensibilidade à insulina foi comprovada através de teste de tolerância à glicose (TTG). Ainda, RAFACHO e colaboradores (2014) verificaram que a administração de 1 mg/Kg i.p. de DEX por cinco dias consecutivos também induziu a hiperglicemia e hiperinsulinemia compensatória.

Para avaliar a homeostase da glicose em roedores geralmente utiliza-se o TTG que se baseia na glicemia antes e após a administração de glicose. Os animais em jejum têm seu nível sanguíneo de glicose medido e logo após recebem uma carga de glicose, via oral ou i.p., e a glicemia é novamente medida em intervalos regulares. Este teste é o mais simples e o primeiro a ser aplicado em modelo animal, fornecendo uma visão fisiológica geral da tolerância à glicose, sem determinar os mecanismos causais. Para complementar o TTG podem ser realizadas medidas de resistência à insulina, como o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA- IR) ou o índice quantitativo de verificação da sensibilidade à insulina (QUICKI), técnicas mais complexas, geralmente utilizadas em estudos com humanos, baseadas na glicemia em jejum e nível plasmático de insulina em jejum (BOWE et al., 2014).

Resistência à Insulina e Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são subprodutos químicos do metabolismo do oxigênio que possuem um elétron não emparelhado e quando produzidas normalmente, ou seja, em pequenas quantidades, participam de processos fisiológicos, como a sinalização celular (SLIMEN et al., 2014). A produção de ERO ocorre em várias organelas, como o retículo endoplasmático, os peroxissomos e a mitocôndria (WEN et al., 2013), porém a maior parte da produção ocorre na mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, principalmente nos complexos I e III (HOLZEROVÁ & PROKISCH, 2015).

As principais ERO podem ser divididas em dois grupos: radicais livres, tais como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO^{\cdot}$) e as espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($O(^1O_2)$) (RAHAL et al., 2014) (Figura 4).



Figura 4 - Fontes de espécies reativas de oxigênio e ação destas espécies na célula (WEN et al., 2013)

Para reduzir os níveis de ERO e/ou neutralizar seus efeitos, o organismo conta com mecanismos de defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. A defesa enzimática ocorre pela ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), que elimina o radical superóxido convertendo-o em H_2O_2 e oxigênio (O_2), pela enzima catalase (CAT) que atua na decomposição de H_2O_2 em H_2O e O_2 e pela enzima glutatona peroxidase (GPx) que atua sobre peróxidos em geral, utilizando glutatona (GSH) como co-fator (VASCONCELOS et al., 2007). A defesa antioxidante não enzimática é realizada por compostos como a

vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol), pró-vitamina A (β -caroteno) e compostos fenólicos, principalmente os flavonoides (BARREIROS et al., 2006).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas e a diminuição do sistema de defesa antioxidante, levando a danos em proteínas, polissacarídeos, lipídeos e DNA tem-se o estresse oxidativo (TURRENS, 2003). Estudos apontam que está envolvido na patogênese de diversas doenças, incluindo DM (KOPPRASCH et al., 2015). Sabe-se que a hiperglicemia resultante da RI aumenta a produção de ERO por diversos mecanismos, como o aumento da via poliólica (ou via dos polióis), auto-oxidação da glicose e formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) e aumento de AGL (Figura 5). Na hiperglicemia, até 35% da glicose é metabolizada pela via poliólica, que converte o excesso de glicose em sorbitol e este em frutose, através de enzimas que consomem nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), necessário para a formação de glutatona reduzida, interferindo na defesa antioxidante (PATEL et al., 2016). Em adição, o excesso de polióis tem sido associado à degeneração e morte de capilares presentes na retina, os primeiros eventos que causam a retinopatia, complicação mais comum da DM e principal causa da cegueira global (FERREIRA et al., 2013).

O cetoaldeído, um produto da auto-oxidação da glicose e um membro dos AGE, produz H_2O_2 e outras ERO, agravando ainda mais o dano oxidativo (PATEL et al., 2016). Também, os AGL liberados pelo tecido adiposo na obesidade provocam lipotoxicidade e estresse oxidativo, além disto, este último leva a oxidação e carbonilação do GLUT4 no TA tornando-o disfuncional e impedindo a captação celular de glicose (BODEN et al., 2015).

Conforme descrito acima, o estresse oxidativo pode causar danos celulares, dentre eles a peroxidação lipídica, um processo de oxidação dos ácidos graxos insaturados das membranas celulares que causa uma grave alteração na funcionalidade das membranas, com perda de fluidez, alteração da função secretora e de troca iônica, vazamento do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos até a morte celular (BEZERRA et al., 2004). Um dos produtos originados neste processo é o malondialdeído (MDA), o qual pode reagir com o ácido tiobarbitúrico, formando compostos corados chamados substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta reação é utilizada como forma de avaliação da lipoperoxidação, o que é de grande importância, pois níveis elevados de

TBARS estão relacionados com o desenvolvimento de RI, DM (BEZERRA et al., 2004), aterosclerose e DCV (TANAKA et al., 2011). Produtos formados pela peroxidação lipídica alteram o funcionamento de diversas proteínas importantes para o metabolismo, dentre elas, a GLUT4 e IRS-1 ou IRS-2, podendo ocasionar ou agravar o quadro de RI, porém esta relação ainda está sendo investigada (INGRAM et al., 2012).

Outra forma de avaliar o estresse oxidativo é através da mensuração das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx e da quantificação das ERO. Ainda, um parâmetro que também tem sido utilizado é a determinação da enzima delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), essencial para todos os organismos aeróbicos que participa da via de formação de moléculas importantes, como por exemplo, o grupo prostético heme da hemoglobina. Esta enzima contém grupos sulfidríla em sua estrutura, que são altamente sensíveis a agentes oxidantes, portanto em situações de estresse oxidativo ela pode estar diminuída (SOUZA et al., 2007). Além disto, a diminuição na atividade desta enzima resulta no acúmulo do substrato ácido 5-aminolevulínico (ALA) que aumenta a produção de ERO e requer maior atividade de enzimas antioxidantes e antioxidantes exógenos para remover estas espécies (LUCCA et al., 2016).

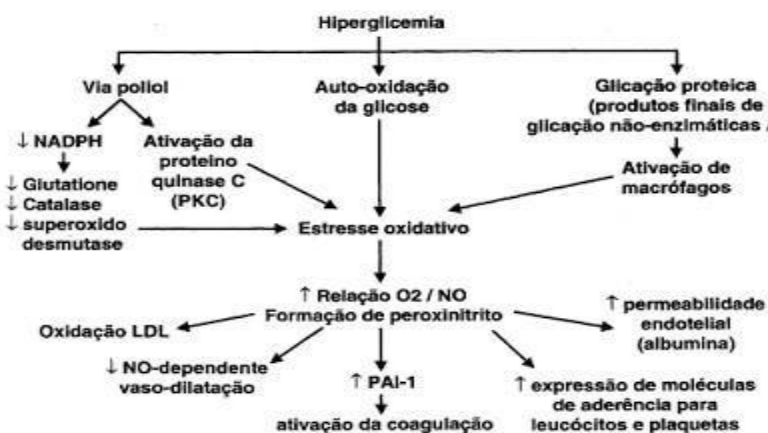


Figura 5: Relação do estresse oxidativo e resistência à insulina (Wajchenberg, 2002)

Resistência à Insulina e Produtos Naturais

Conforme visto anteriormente, os principais medicamentos utilizados para o tratamento da DM e melhora da sensibilidade à insulina podem ocasionar efeitos adversos, como hipoglicemia, alterações gastrointestinais e eventos cardiovasculares. Diante disto, a busca por tratamento alternativo com menos

efeitos indesejados é fundamental. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no Brasil, 80% da população utilizam terapias alternativas como forma de tratamento, sendo as plantas medicinais a mais comum a ser utilizada (WEISHEIMER et al., 2015). A busca por novos medicamentos antidiabéticos tem se concentrado em plantas medicinais, devido sua eficácia em ensaios clínicos e menores efeitos colaterais (TAG et al., 2012).

De inúmeras plantas relatadas como hipoglicemiantes, cerca de 200 compostos foram isolados e apontados como os responsáveis pelos efeitos antidiabéticos das mesmas e dentre estes compostos destacam-se flavonoides, terpenoides, alcaloides, esteroides e ácidos fenólicos. Apesar de o mecanismo de ação de cada composto ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que eles agem melhorando a sensibilidade à insulina e a via de sinalização deste hormônio, protegendo as células β pancreáticas contra danos, aumentando a secreção de insulina e a defesa antioxidante, além de atenuarem a inflamação (EDDOUKS et al., 2014). Uma alimentação em longo prazo rica em polifenóis tem sido associada à redução do risco de câncer, DM, DCV e distúrbios neurológicos (DA CUNHA et al., 2016).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas e vegetais e podem ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e os não flavonoides. Os flavonoides, um grupo restrito de polifenóis, conferem às frutas características sensoriais e protegem os tecidos do corpo humano contra o estresse oxidativo. Os não flavonoides são derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico, incluindo o ácido gálico e ácido cafeico, entre outros. Sabe-se que as frutas que apresentam principalmente coloração vermelha a azul são as mais importantes fontes de compostos fenólicos da alimentação (BARCIA, 2009). As antocianinas, pertencentes ao grupo dos flavonóides, são um dos mais importantes pigmentos vegetais que conferem a coloração rosa, vermelho, roxo e azul às frutas (CUI et al., 2016). Pesquisadores mostram haver relação entre a ingestão de alimentos ricos em antocianinas, como morango, uva, mirtilo, cereja, entre outros, e o menor risco de desenvolvimento de DM, obesidade, hipertensão, dislipidemia e inflamação (GUO & LING, 2015).

Estudos recentes mostram que ao neutralizar as ERO, compostos antioxidantes tornam-se eficazes na prevenção de DM em modelos animais, bem como amenizam a gravidade das complicações diabéticas. Os flavonóides atuam

como agentes antidiabéticos através da redução dos níveis de glicose, colesterol e TG plasmáticos, e provavelmente, aumentando a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas (PARIKH et al., 2014).

O gênero *Eugenia*, um dos maiores da família *Myrtaceae*, possui em torno de 500 espécies nativas da América do Sul amplamente distribuídas em regiões com clima tropical e subtropical, e dentre estas espécies a *Eugenia uniflora* (*E. uniflora*) vem ganhando destaque na indústria de cosméticos, devido seu cheiro agradável, na indústria alimentícia e na medicina popular. *E. uniflora*, popularmente conhecida como “cereja brasileira”, “pitanga” ou “pitangueira” (Figura 6) é uma espécie rica em fenóis, flavonoides, antocianinas, carotenoides, entre outros compostos, que conferem ao seu extrato importantes efeitos: antiparasitário, antirreumático, anti-inflamatório e antioxidante (DA CUNHA et al., 2016).

Algumas espécies do gênero *Eugenia* já possuem sua atividade hipoglicêmica comprovada, em especial a *Eugenia jambolana*, conhecida como ameixa preta (RAVI et al., 2003; SHARMA et al., 2006; MARY et al., 2012). A pitanga tem sido utilizada na América do Sul para tratar hipercolesterolemia, hipertensão, doença digestiva, febre, entre outras enfermidades, e no Paraguai para tratamento da obesidade e DM, porém seus efeitos farmacológicos e mecanismos de ação ainda não são bem elucidados, pois são raros os estudos envolvendo esta fruta (ARAI et al., 1999; SCHUMACHER et al., 2015).



Figura 6: Pitanga (*Eugenia uniflora*) (LIRA JUNIOR et al., 2010)

Outra espécie da família *Myrtaceae* que merece atenção é o *Psidium cattleianum*, conhecido popularmente como “araçá”, “araçá rosa”, “araçá

vermelho”, “araçá do campo” ou ainda “goiaba de morango”, uma planta nativa do Brasil, amplamente cultivada no Sul do Brasil, porém ainda inexplorada (Figura 7). O araçá possui sabor doce acidulado, forte aroma, grande quantidade de vitamina C e é utilizado na medicina popular para tratamento de distúrbios dolorosos, diarreia, cárie dentária e DM (RIBEIRO et al., 2014). Poucos trabalhos revelam os componentes e as propriedades farmacológicas do araçá, mas já se sabe que seus extratos são ricos em compostos fenólicos, principalmente ácido gálico, e que apresentam atividade antioxidante, antifúngica (CASTRO et al., 2014), antimicrobiana e analgésica (ALVARENGA et al., 2013).



Figura 7: Araçá (*P. cattleianum*) (<https://www.thinklink.com/scene/593804776269938688>).

Uma espécie semelhante ao *P. cattleianum* é a *P. guajava*, conhecida popularmente como goiaba, amplamente utilizada na medicina popular para o tratamento de diversos distúrbios, tais como: do sistema respiratório, sistema genito-urinário, sistema nervoso, digestivo, circulatório, doenças de pele, infecciosas e parasitárias, neoplasias, entre outros (MORAIS-BRAGA et al., 2017).

A primeira análise fitoquímica de *P. cattleianum* foi realizada em 2012, mostrando um teor fenólico total de 4,49 mg e, quando comparado com *P. guajava*, o fruto de araçá apresentou maior conteúdo fenólico e maior teor de vitamina C, além de maiores atividades antioxidante e antimicrobiana, destacando a importância da pesquisa envolvendo este fruto (MCCOOK- RUSSELL et al., 2012).

PARTE III

Capítulo 1

Manuscrito

Todos os resultados desta dissertação
serão apresentados na forma de manuscrito submetido à revista Redox Report.

Antioxidant, antihyperglycemic and antidyslipidemic effects elicited by Brazilian native fruit extracts in an animal model of insulin resistance

Juliane Cardoso^a, Pathise Souto Oliveira^a, Natália Pontes Bona^a, Flávia Aleixo Vasconcellos^b, Jucimara Baldissarelli^c, Marcia Vizzotto^d, Mayara Pereira Soares^e, Roselia Maria Spanevello^e, Claiton Leoneti Lencina^a, Rejane Giacomelli Tavares^{a*}, Francieli Moro Stefanello^{a*}

^aLaboratório de Biomarcadores, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^bLaboratório de Química Aplicada a Bioativos, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

^cLaboratório de Enzimologia Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil.

^dEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil.

^eLaboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS, Brazil.

*Address reprint requests to: Francieli Moro Stefanello, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355; E-mail: francieli.stefanelo@ufpel.edu.br and Rejane Giacomelli Tavares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, CEP 96160-000, Capão do Leão, RS, Brazil. Phone: +55 53 32757355; E-mail: tavares.rejane@gmail.com

Abstract

Objective: Insulin resistance (IR) plays an important role in the development of many diseases, such as diabetes mellitus. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of the native Brazilian fruit extracts on metabolic parameters and hepatic oxidative markers in an animal model of insulin resistance induced by dexamethasone (DEX).

Methods: Wistar rats were treated with water, *E. uniflora* or *P. cattleianum* extracts, once a day for 21 days. In the last 5 days, the animals received an intraperitoneal injection of saline or DEX.

Results: DEX caused a reduction in body weight gain and relative pancreatic weight, as well as glucose intolerance, and an increase in serum glucose and triacylglycerols levels. The extracts were able to prevent the hyperglycemia and hypertriglyceridemia. DEX caused an increase in the levels of thiobarbituric acid reactive substances and reactive oxygen species production in liver of rats and both extracts prevented these changes. Besides, hepatic GPx activity was reduced by DEX. However, total thiol content and activities of the catalase, superoxide dismutase and delta-aminolevulinate dehydratase were not altered in any of the tested groups in rat liver.

Discussion: Thus, extracts of *Eugenia uniflora* and *Psidium cattleianum* elicited important antihyperglycemic, antidyslipidemic and antioxidant effects, and may be useful in the therapeutic management of alterations due to IR.

Keywords: Insulin resistance, Redox status, *Eugenia uniflora*, *Psidium cattleianum*, Rats

1. Introduction

Insulin resistance (IR) is a reduction of the responses of insulin target cells and tissues to a physiological concentration of this hormone, characterized for insulin insensitivity on cellular and tissue response, including muscle, adipose and liver tissue [1]. IR is widely associated abdominal obesity, type 2 Diabetes (T2D) and metabolic syndrome (MetS). Additionally, it can be a risk factor for the development of dyslipidemias, cardiovascular diseases and steatosis [2,3].

Some authors have suggested that IR contributes to increase of oxidative stress, probably for an alteration on mitochondrial function, and this increase may also aggravate the IR situation [4-5]. It is well known that oxidative stress is caused by an imbalance in redox state, owing to either excessive production of reactive species or disturbance of the antioxidant system and can lead to the damage of cell membranes and other functional components such as proteins, lipids, and DNA. In the aerobic metabolism are normally generated reactive oxygen species (ROS) and also reactive nitrogen species (RNS). To limit oxidative damage, the body has antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). Additionally, the exogenous defense is formed for substances acquired by diet, such as flavonoids, vitamins, minerals, among others [6,7].

Eugenia uniflora (popularly known as *pitanga*) and *Psidium cattleianum* (popularly known as *araçá*) are Brazilian native fruits belonging to *Myrtaceae* family. These geniuses have been studied for to present several health benefits such as antioxidant, anti-inflammatory, diuretic and hypoglycemic. Some authors relate these effects to secondary metabolites occurring in both species, mainly phenolic compounds [7-9].

As far we aware there are very few studies with *E. uniflora* and *P. cattleianum* fruits. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of these native fruits extracts on metabolic parameters and hepatic oxidative stress markers in animal model of IR induced by dexamethasone (DEX).

2. Material and Methods

Fruits extracts preparation

E. uniflora and *P. cattleianum* fruits were harvested on orchard belonging to *Embrapa Clima Temperado* (Brazilian Agricultural Research Corporation) Pelotas/RS, Brazil (31°40'47"S and 52°26'24"W). After picking, the fruits were immediately frozen at -20°C and protected from light. The extracts were prepared according Bordignon et al. [10] with minor modifications. Briefly, unprocessed frozen fruits were sonicated for 30 min at 25°C in 90 mL 70:30 v/v ethanol-water (pH 1.0). The crude extracts were filtered; the ethanol removed under reduced pressure and then lyophilized. These procedures were performed in triplicate and sheltered from light.

Phytochemical characterization

Total phenolic, flavonoid and anthocyanins contents

The total phenolic content was determined according to Singleton et al. [11] with minor modifications and expressed as milligrams of gallic acid per 1 g of dried extract. The total flavonoid content was determined according to Miliauskas et al. [12] with minor modifications. Data were presented as expressed as milligrams of rutin per 1 g of dried extract. Anthocyanins were quantified by the pH differential method [13] and expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside (C3G) per 1 g of dried extract. All data were presented as mean $\pm$ SD values and analyses were performed in triplicate.

Animals and drug treatments

Forty-eight adult male Wistar rats were obtained from Central Animal House of the Universidade Federal de Pelotas (UFPe), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, where were kept under appropriate conditions, such as, temperature controlled (22 $\pm$ 1°C), on a 12 h light/dark cycle, and received commercial standard chow and water *ad libitum*. All animal procedures used were approved by the Ethics Committee

on Animal Experimentation of the Institution, under the protocol number: CEEA 5747/2015.

The animals were divided into the following experimental groups: Group I (control/Vehicle), group II (control/*E. uniflora*), group III (control/*P. cattleianum*), group IV (DEX/Vehicle), group V (DEX/*E. uniflora*) and group VI (DEX/*P. cattleianum*). The groups I and IV received distilled water, the groups II and V received 200 mg/Kg b.w./day of *E. uniflora* extract and the groups III and VI received 200 mg/Kg/day of *P. cattleianum*. The distilled water and extracts were administered orally once a day for 21 days. In the last 5 days, the groups IV, V and VI received DEX injection (1 mg/Kg b.w), intraperitoneally (i.p). The doses of fruit extracts and DEX were chosen according to Oliveira et al. [14] and Rafacho et al. [15], respectively.

Body weight gain

Changes in body weight of rats were measured throughout the experimental period. The weight of each rat was recorded on day 0 and at weekly intervals throughout the course of the study.

Sample collection and biochemical assay

After the 21 days of experiment all animals were submitted to euthanasia. Blood was collected and centrifuged at 3500 rpm for 15 min and the serum resulting was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further biochemical analysis. Liver was dissected and stored for further determination of oxidative stress parameters. Pancreas was dissected and weighed.

Glucose tolerance test

The glucose tolerance test was realized in the last day of experiment. Rats received 50% glucose solution (2 mg/g b.w. i.p) and 0, 30, 60, and 120 min after

injection the blood of tail was assessed by a small tail puncture and the glucose levels were measured by glucometer (AccuChek Active, Roche Diagnostics®, USA).

Biochemical parameters

Measurements of serum glucose, total cholesterol and triacylglycerol levels were determined using commercially available diagnostic kits supplied by Labtest® (Labtest, MG, Brazil).

Oxidative stress parameters

Reactive oxygen species (ROS)

The ROS formation was determined according to Ali et al. [16], with some modifications. In this assay, the oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent dichloro-fluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular ROS. ROS levels were expressed as $\mu\text{mol DCF/mg of protein}$.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

For determination of lipid peroxidation TBARS levels were determined according to the method described by Ohkawa et al. [17] and reported as $\text{nmol TBARS/mg protein}$.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was measured by the method described by Misra and Fridovich [18] and the specific activity was reported as units/mg protein

Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed according to Aebi [19] based on the decomposition of H_2O_2 monitored at 240 nm at ambient temperature. The specific activity was reported as units/mg protein .

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity was measured using a commercial kit (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, United Kingdom). The specific activity was reported as units/mg protein.

Aminolevulinic acid dehydratase activity (ALA-D) activity

ALA-D activity was assayed according to the method of Sassa [20] by measuring the rate of porphobilinogen (PBG) formation and data was expressed as nmol PBG/h/mg protein.

Total thiol content assay

This assay was performed as described by Aksenov and Markesbery [21]. The method is based on the reduction of DTNB by thiols, which in turn, becomes oxidized (disulfide) generating a yellow derivative (TNB) whose absorption is measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were reported as nmol TNB/mg of protein.

Protein Determination

Protein was determined by the method of Lowry [22] using bovine serum albumin as standard.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Glucose tolerance was analyzed by Repeated Measures Analyses of Variance (ANOVA) and Bonferroni's *post-hoc* test. Parametric variables were tested by two-way ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test. $P < 0.05$ was considered to represent a significant difference in the analysis.

3. Results

The total phytochemical determination in *E. uniflora* and *P. cattleianum* extracts are showed on Table 1.

As shown in Figure 1, DEX induced an impaired glucose tolerance ($P<0.01$) and treatment with *E. uniflora* and *P. cattleianum* were able to prevent this change.

The metabolic parameters were measured after treatment with the extracts. The results are showed on Table 2 in which was possible to see that there was a reduction of weight gain (treatment: [$F(2,32) = 3.87, P<0.05$], DEX: [$F(1,32) = 122.11, P<0.001$], interaction: [$F(2,32) = 3.78, P<0.05$]), as well as relative pancreatic weight in the DEX/vehicle (treatment: [$F(2,26) = 3.29, P>0.05$], DEX: [$F(1,26) = 45.05, P<0.001$], interaction: [$F(2,26) = 1.95, P>0.05$]). However, extracts did not prevent these alterations. As regards serum biochemical parameters, DEX/vehicle group had an increase on glucose (treatment: [$F(2,36) = 11.02, P<0.001$], DEX: [$F(1,36) = 12.18, P<0.01$], interaction: [$F(2,36) = 10.45, P<0.001$]) and triacylglycerols (treatment: [$F(2,19) = 92.72, P<0.001$], DEX: [$F(1,19) = 375.68, P<0.001$], interaction: [$F(2,19) = 136.30, P<0.001$]) levels when compared to control group, additionally the consumption of *E. uniflora* and *P. cattleianum* prevented these changes caused by DEX. No difference was observed in total cholesterol level (treatment: [$F(2,41) = 1.22, P>0.05$], DEX: [$F(1,41) = 3.55, P>0.05$], interaction: [$F(2,41) = 0.22, P>0.05$]).

The oxidative stress parameters evaluated in liver of animals treated with *E. uniflora* and *P. cattleianum* are expressed on Table 3. The TBARS values (treatment: [$F(2,19) = 5.89, P<0.05$], DEX: [$F(1,19) = 28.32, P<0.001$], interaction: [$F(2,19) = 5.71, P<0.05$]) and ROS production (treatment: [$F(2,22) = 36.66, P<0.001$], DEX: [$F(1,22) = 36.48, P<0.001$], interaction: [$F(2,22) = 36.87, P<0.001$]) were enhanced by DEX administration and treatment with *E. uniflora* and *P. cattleianum* prevented these effects. GPx activity was reduced on group DEX/vehicle when compared to control/vehicle (treatment: [$F(2,18) = 0.69, P>0.05$], DEX: [$F(1,18) = 45.63, P<0.001$], interaction: [$F(2,18)$

= 0.16, $P > 0.05$). However, sulfhydryl (SH) content (treatment: [$F(2,20) = 2.48$, $P > 0.05$], DEX: [$F(1,20) = 0.65$, $P > 0.05$], interaction: [$F(2,20) = 1.16$, $P > 0.05$]) and the enzymatic activities of ALA-D (treatment: [$F(2,18) = 23.29$, $P > 0.05$], DEX: [$F(1,18) = 2.78$, $P > 0.05$], interaction: [$F(2,18) = 3.43$, $P > 0.05$]), SOD (treatment: [$F(2,18) = 0.85$, $P > 0.05$], DEX: [$F(1,18) = 1.44$, $P > 0.05$], interaction: [$F(2,18) = 0.47$, $P > 0.05$]) and CAT (treatment: [$F(2,18) = 2.74$, $P > 0.05$], DEX: [$F(1,18) = 0.23$, $P > 0.05$], interaction: [$F(2,18) = 2.82$, $P > 0.05$]) were not significant different in any group.

4. Discussion

Health benefits of the dietary flavonoids, including management of MetS, obesity and diabetes mellitus are widely known [23]. In our study, we demonstrated that *E. uniflora* and *P. catlleianum* presents important content of phenolic compounds, mainly anthocyanins. For small fruits as blackberry, blueberry and strawberry previous research had determined as basis of 100 to 820 mg/100 g and 14 to 290 mg/100 g for total phenolic and flavonoid contents, respectively [24]. These compounds may have various antidiabetic effects via mechanisms other than cellular signaling proteins found in the insulin-dependent and independent pathways, such as the modification of glucagon-like peptide-1 (GLP-1), alteration of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activities, protection against glucolipotoxicity, and modification of endogenous antioxidants [25]. KHOO and collaborators [26] demonstrated that extract of *Canarium odontophyllum*, a fruit rich on anthocyanins, inhibited the oxidative stress, further inhibited binding of LDL to endothelial cells and showed protective effect against lipid peroxidation.

In addition, there are studies demonstrating that anthocyanins enhance the endogenous antioxidant defense system. The purified anthocyanin C3G increased glutathione (i.e., antioxidant) synthesis in the liver of diabetic db/db mice through upregulation of glutamate-cysteine ligase catalytic subunit expression and enhanced serum levels of SOD and CAT after injections of pelargonidin (i.e., anthocyanidin) in

the streptozotocin-induced diabetic rats [25]. Other study demonstrated that C3G reduced the cell death in pancreatic β -cells induced by oxidative stress acting as a protective factor against diabetes [27]. Still, SCHUMACHER et al. [7] demonstrated that *E. uniflora* aqueous extract reduced the incidence of T2D, inflammatory cell infiltration and the oxidative stress, besides increasing hepatic glutathione levels and serum insulin in non-obese diabetic mice. These results may be associated with phenolic compounds (gallic acid, rutin and ellagic acid) found in chromatography analyses of the extract used.

The consumption of fat food and a sedentary lifestyle, the use of glucocorticoids, including DEX, has been associated with IR. These drugs are widely used for treatment of allergies, asthma, rheumatoid arthritis among other pathologies and his chronic use is associated with several negative effects in the metabolism of carbohydrates, causing IR, glucose intolerance, T2D, dyslipidemia among others [15,28].

In this study we evaluated the effects of two extracts belonging to *Myrtaceae* family on metabolic and oxidative stress parameters in animal model of IR induced by DEX. This experimental model is considered a suitable model for the investigation of drugs influencing the mechanisms involved in the pathogenesis of T2D and MetS. The relation between DEX and IR can be explained by an increase in gene expression, mainly FKBP5 that decrease glucose uptake [29]. In addition, DIONÍSIO et al. [30] showed that DEX decreases IRS-1, AKT levels and GLUT-4 translocation to the membrane. Another option to explain this relationship is based on reduction in β -cell mass pancreatic in rats [31] and in humans [32], which may be a cofactor for the development of T2D, directly related to the insulin secretion. This decrease may occurs due to a continuous apoptosis caused by several factors, among them, the excessive production of ROS, resulting in loss of β -cell and decreased function of these cells [33,34]. Similarly, in our study we verified a reduction of relative pancreatic weight in rats that received DEX. It is well known that IR can induce dyslipidemia, therefore, triacylglycerol (TAG), total cholesterol (TC) and high-density

lipoprotein (HDL) can be used as markers of IR. Still, hypertriglyceridemia is the most common feature of dyslipidemia in cases of IR and type 2 diabetes mellitus. In our study we demonstrated that serum levels of TAG were increased in animals treated with DEX and both extracts prevented this increase. When we evaluated the IR and TG, several authors showed that there are an important correlation between TG and IR, due compensatory hyperinsulinemia caused by IR that induces the flow of free fatty acid to the liver and adipose tissue providing substrate for TAG production [35,36] or the know ability of DEX increased gluconeogenesis, downregulation of GLUT2 expression on the cell membrane, and increased TAG and VLDL, through activation the expression of several genes encoding enzymes in TAG synthesis and cause lipids redistribution with the lipolysis in adipocytes as well as TAG accumulation in the liver [37].

Mitochondrion plays a crucial role in DEX-induced oxidative stress. DEX may lead to an augment in ROS production that directly causes mitochondrial dysfunction, reduces cellular energy yield, promotes the release of cytochrome c, decreases mitochondrial permeability, and leads to oxidative stress and apoptosis [38]. In our study the DEX administration did not alter SH content as well as CAT, SOD and ALA-D activities. However, it reduced GPx activity, caused lipid peroxidation and a larger production of ROS, indicating a dysregulation of redox homeostasis in the liver of these rats. These findings are important since the oxidative damage plays a critical role in the pathogenesis of obesity, atherosclerosis, T2D and IR. The major end-product of lipid peroxidation 4-hydroxynonenal may induce the IR by inactivating critical components of the insulin signaling pathway [29]. Additionally, we demonstrated that *E. uniflora* and *P. cattleianum* fruit extracts prevent lipid peroxidation and ROS formation in the liver, suggesting an important antioxidant action of these extracts in the experimental model of IR.

In conclusion, our results suggest that *E. uniflora* and *P. cattleianum* extracts prevent the hyperglycemia and hypertriglyceridemia caused by DEX induced IR and exert an antioxidant action through the prevention of liver ROS and TBARS formation.

Acknowledgments

The Brazilian research funding agencies FAPERGS, CAPES and CNPq supported this study.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest in the study.

References:

- [1] YU J, ZHENG J, LIU XF, et al. Exercise improved lipid metabolism and insulin sensitivity in rats fed a high-fat diet by regulating glucose transporter 4 (GLUT4) and musclin expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2016; 49:1414-1431.
- [2] BROWN AE, WALKER M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Current Cardiology Reports*. 2016;18:75.
- [3] CAPEAU J. Insulin resistance and steatosis in humans. *Diabetes and metabolism*. 2008;34:649-657.
- [4] HAGVE M, GJESSING PF, FUSKEVAG OM, et al. Skeletal muscle mitochondria exhibit decreased pyruvate oxidation capacity and increased ROS emission during surgery-induced acute insulin resistance. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 2015;308:613-620.
- [5] MATSUZAWA-NAGATA N, TAKAMURA T, ANDO H, et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2008; 57:1071-1077.
- [6] RAHAL A, KUMAR A, SINGH V, et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International*. 2014; 2014:1-19.
- [7] SCHUMACHER NSG, COLOMEU TC, FIGUEIREDO D, et al. Identification and Antioxidant Activity of the Extracts of *Eugenia uniflora* Leaves. Characterization of the Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). *Antioxidants*. 2015;4:662-680.
- [8] FIGUERÔA EO, SILVA LCN, MELO CML, ET AL. Evaluation of Antioxidant, Immunomodulatory, and Cytotoxic Action of Fractions from *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia malaccensis* L.: Correlation with Polyphenol and Flavanoid Content. *The Scientific World Journal*. 2013; 2013:1-7.
- [9] SCUR MC, PINTO FGS, PANDINI JA, et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Brazilian Journal of Biology*. 2016; 76:101-108.
- [10] BORDIGNON JR CL, FRANCESCETTO V, NIENOW AA, et al. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2009; 29:183-188.
- [11] SINGLETON VL, ORTHEFER R, LAMUELA-RANVENTÓS R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 1999; Parker L, ed.:152-159.
- [12] MILIAUSKAS G, VENSKUTONIS PR, VAN TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 2014;85:231- 237.
- [13] LEE J, DURST RW, WROLSTAD RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by

the pH differential method: Collaborative study. Journal of AOAC Internacional. 2005;8:1269-1278.

[14] OLIVEIRA PS, GAZAL M, FLORES NP, et al. Vaccinium virgatum fruit extract as an important adjuvant in biochemical and behavioral alterations observed in animal model of metabolic syndrome. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 88:939–947.

[15] RAFACHO A, GONÇALVES-NETO LM, SANTOS-SILVA JC, et al. Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats. Plos One. 2014;9:4

[16] ALI SF, LEBEL CP, BOND SC. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. Neurotoxicology. 1992;13:637-648.

[17] OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Annual Review Medicine. 1979;95:351-358.

[18] MISRA HP, FRIDOVICH I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. The Journal of Biological Chemistry. 1972;247:3170-3175.

[19] AEBI H. Catalase in vitro. Methods in Enzymology. 1984;105:121-126.

[20] SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. Enzyme. 1982;28:133- 145.

[21] AKSENOV MY, MARKESBERY WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes on the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters. 2001;302:141-145.

[22] LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 1951;193:265-275.

[23] VINAYAGAM R, XU B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. Nutrition and Metabolism. 2015;12:1- 20.

[24] BIEGELMEYER R, ANDRADE JMM, ABOY AL, et al. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. Journal of Food Science. 2011;76:991-996.

[25] STULL AJ. Blueberries' impact on insulin resistance and glucose intolerance. Antioxidants. 2016;5:1-11.

[26] KHOO HE, AZLAN A, ISMAIL A, et al. Inhibition of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Anthocyanins from Defatted Canarium odontophyllum Pericarp and Peel Using In Vitro Bioassays. Plos One. 2014;9.

[27] LEE JS, KIM YR, SONG IG, et al. Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis. International Journal of Molecular Medicine. 2015;35:405-412.

- [28] BIGHETTI BB, ASSIS GF, VIEIRA DC, et al. Long-term dexamethasone treatment alters the histomorphology of acinar cells in rat parotid and submandibular glands. *International Journal of Experimental Pathology*. 2014;95:351-363.
- [29] PEREIRA MJ, PALMING J, SVENSSON MK, et al. FKBP5 expression in human adipose tissue increases following dexamethasone exposure and is associated with insulin resistance. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2014;63:1198–1208.
- [30] DIONÍSIO TJ, LOUZADA JCA, VISCELLI BA, et al. Aerobic Training Prevents Dexamethasone-Induced Peripheral Insulin Resistance. *Endocrine Research*. 2014;46:484-489.
- [31] SHEN C-N, SECKL JR, SLACK JMW, et al. Glucocorticoids suppress β -cell development and induce hepatic metaplasia in embryonic pancreas. *Biochemical Society*. 2003;375:41-50.
- [32] HENQUIN JC, RAHIER J. Pancreatic alpha cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2011;54:1720-1755.
- [33] GESINA E, TRONCHE, F, HERRERA P, et al. Dissecting the Role of Glucocorticoids on Pancreas Development. *Diabetes*. 2004;53:2322-2329.
- [34] MEIER JJ, BONADONNA RC. Role of Reduced b-Cell Mass Versus Impaired b- cell Function in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Pathophysiology*. 2013;36:113-119.
- [35] LI, N.; FU, J.; KOONEN, D.P.; KUIVENHOVEN, J.A.; SNIEDER, H.; HOFKER, M.H. Are hypertriglyceridemia and low HDL causal factors in the development of insulin resistance? *Atherosclerosis*, v. 233, p. 130-138, 2014.
- [36] PARK SY, CHO YJ, LEE SR, et al. Triglyceride Is a Useful Surrogate Marker for Insulin Resistance in Korean Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Yonsei Medicine Journal*. 2015;56:785-792.
- [37] TOVCHIGA O V. The influence of goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) tincture and metformin on the carbohydrate and lipid metabolism in dexamethasone-treated rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2016;16:1-11.
- [38] YI J, ZHU R, WU J, et al. In vivo protective effect of betulinic acid on dexamethasone induced thymocyte apoptosis by reducing oxidative stress. 2016;68:95-100.
- [39] MURDOLO G, PIRODDI M, LUCHETTI F, et al. Oxidative stress and lipid peroxidation by-products at the crossroad between adipose organ dysregulation and obesity-linked insulin resistance. *Biochimic*. 2013;85:585-594.

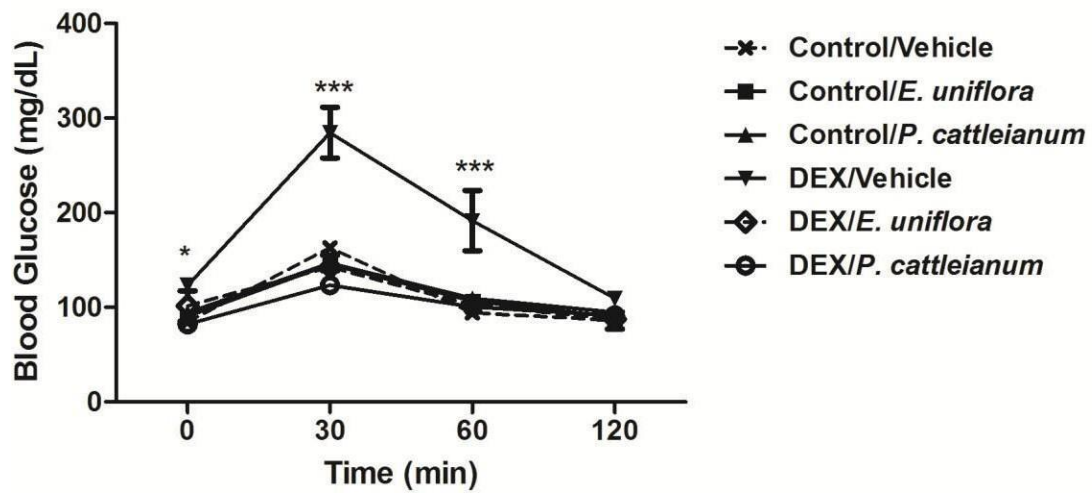


Figure 1: Glucose tolerance test measured at the baseline (0), 30, 60 and 120 min after glucose injection (2 mg/g body weight). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. (***) $P < 0.001$ compared to the control/vehicle. Repeated measures ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. DEX = dexamethasone

Table 1. Phytochemical determination of *E. uniflora* and *P. cattleianum* fruit extracts

	Total phenolic	Flavonoid	Anthocyanin
<i>E. uniflora</i>	7.92 ± 0.23	5.50 ± 0.68	1.72 ± 0.05
<i>P. cattleianum</i>	16.72 ± 0.26	15.24 ± 2.09	2.48 ± 0.09

Data are expressed as mean ± S.D. Total phenolic content is reported as mg of gallic acid/g of dried extract. Flavonoid content is reported as mg of rutin/g of dried extract. Anthocyanins are expressed as mg of cyanidin-3-glucoside/g of dried extract.

Table 2. Effect of *E. uniflora* and *P. cattleianum* fruit extracts treatment on metabolic parameters of dexamethasone-treated rats (DEX)

	Control/ Vehicle	Control/ <i>E. uniflora</i>	Control/ <i>P. cattleianum</i>	DEX/ Vehicle	DEX/ <i>E. uniflora</i>	DEX/ <i>P. cattleianum</i>
Weight gain	107.71±8.74	105.57±2.50	93.17±4.64	42.14±3.58 ^{***}	67.20±4.70 ^{**}	50.17±5.11 ^{***}
Relative pancreatic weight	0.75±0.05	0.64±0.04	0.61±0.02	0.50±0.03 ^{***}	0.46±0.02 ^{***}	0.49±0.03 ^{***}
Glycemia	102.27±8.93	96.30 ± 4.53	107.79±2.74	156.55±8.20 ^{***}	102.36±6.05 ^{###}	104.23±7.64 ^{###}
Total cholesterol	155.42±7.18	144.64±10.51	157.11±4.76	142.57±1.61	139.38±4.42	145.38±2.20
Triacylglycerol	63.19±2.88	68.83±4.94	74.07±2.67	177.47±5.05 ^{***}	91.67±4.81 ^{###}	93.98±2.84 ^{###}

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n =4-10). Weight gain and relative pancreatic weight are reported as g and g/100 g b.w, respectively. Glycemia, total cholesterol and triacylglycerols are reported as mg/dL. (***) Denotes $P < 0.001$ as compared to the Control/Vehicle.

(**) Denotes $P < 0.01$ as compared to Control/Vehicle. (###) Denotes $P < 0.001$ as compared to DEX/Vehicle.

Table 3. Effect of *E. uniflora* and *P. cattleianum* fruit extracts treatment on oxidative stress parameters in the liver of dexamethasone- treated rats (DEX)

	Control/ Vehicle	Control/ <i>E. uniflora</i>	Control/ <i>P.cattleianum</i>	DEX/ Vehicle	DEX/ <i>E. uniflora</i>	DEX/ <i>P. cattleianum</i>
TBARS	1.53±0.05	1.66±0.29	1.36±0.07	2.81±0.06***	1.89±0.18 [#]	1.92±0.11 ^{###}
SH	37.12±0.31	31.32±0.52	30.89±3.94	33.00±1.053	28.27±1.12	33.41±3.94
DCF	16.05±0.81	16.75±0.45	14.74±0.89	30.66±1.79***	14.10±0.67 ^{###}	17.68±1.10 ^{###}
CAT	101.92±8.5	114.66±3.3	108.11±5.4	99.36±7.72	99.38±2.33	119.33±3.09
SOD	7.65±0.14	7.47±0.63	7.85±0.34	8.61±0.41	7.64±0.66	8.07±0.34
GPx	127.92±11.7	132.98±18.4	145.14±10.1	74.67±4.18*	79.15±3.86*	81.55±5.22
ALA-D	3.91±0.44	4.12±0.17	4.69±0.16	3.70±0.28	4.20±0.16	4.26±0.32

Data are expressed as mean ± S.E.M. (n =4-5). (***) Denotes $P < 0.001$ as compared to the Control/Vehicle.

(*) Denotes $P < 0.05$ as compared to the Control/Vehicle. (###) $P < 0.001$ as compared to DEX/Vehicle. ([#]) $P < 0.05$ as compared to DEX/Vehicle.

PARTE IV

4 Conclusão

Os resultados encontrados no presente estudo permitem-nos concluir que:

- A administração de DEX causou redução do ganho de peso corporal e do peso pancreático relativo, intolerância a glicose, bem como aumento nos níveis de glicose e de triacilglicerois séricos. Além disto, ocasionou dano oxidativo em fígado, pois induziu peroxidação lipídica e aumentou a produção de ERO neste tecido.
- Os extratos de frutos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* foram eficazes na prevenção da hiperglicemia e da hipertrigliceridemia. Ainda, o consumo destes extratos preveniu o estresse oxidativo induzido em fígado de animais submetidos ao modelo de RI.

Diante destes achados, é possível considerar que os extratos de *E. uniflora* e *P. cattleianum* possuem importantes ações antihiperglicêmica, antidislipidêmica e antioxidante, podendo atuar na prevenção de alterações decorrentes da RI. Contudo, mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos de ação que levam a estes efeitos.

Referências

- ADEGBIJA, O.; HOY, W. WANG, Z. Prediction of cardiovascular disease risk using waist circumference among Aborigines in a remote Australian community. *BMC Public Health*, 2015.
- ALDEKHAIL, N.M.; LOGUE, J.; MCLOONE, P.; MORRISON, D.S. Effect of orlistat on glycaemic control in overweight and obese patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity reviews*, v. 16, p. 1071-1080, 2015.
- ALTAF, Q.A.; BARNETT, A.H.; TAHRANI, A.A. Novel therapeutics for type 2 diabetes: insulin resistance. *Diabetes, obesity and metabolism*, v. 7, p. 319-334, 2014.
- ALVARENGA, F.Q.; MOTA, B.C.F.; LEITE, M.N.; FONSECA, J.M.C.; OLIVEIRA, D.A.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; ESPERANDIM, V.; BORGES, A.; LAURENTIZ, R.S. In vivo analgesic activity, toxicity and phytochemical screening of the hydroalcoholic extract from the leaves of *Psidium cattleianum* Sabine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, p. 280-284, 2013.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Anvisa libera fabricação e venda de Sibutramina. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/09/anvisa-libera-fabricacao-e-venda-de-sibutramina>> Acesso em: 17 jan. 2017.
- ARAI, I.; AMAGAYA, S.; KOMATSU, Y.; OKADA, M.; HAYASHI, T.; KASAI, M.; ARISAWA, M.; MOMOSE, Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p. 307-314, 1999.
- BARCIA, M.T. **Composição centesimal e de fitoquímicos em Jambolão (*Syzygium cumini*)**. 2009, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
- BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BEZERRA, F.J.L.; REZENDE, A.A.; RODRIGUES, S.J.; ALMEIDA, M.G. Thiobarbituric acid reactive substances as an index of lipid peroxidation in sevoflurane-treated rats. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.64, p. 640-649, 2004.
- BIGHETTI, B.B.; ASSIS, G.F.; VIEIRA, D.C.; VIOLATO, N.M.; CESTARI, T.M.; TAGA, R.; BOSQUEIRO, J.R.; RAFACHO, A. Long-term dexamethasone treatment alters the histomorphology of acinar cells in rat parotid and submandibular glands. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 95, p.351-363, 2014.
- BODEN, G.; HOMKO, C.; BARRERO, C.A.; STEIN, T.P.; CHEN, X.; CHEUNG, P. FECCHIO, C.; KOLLER, S.; MERALI, S. Excessive caloric intake acutely causes

oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men. **Science Translational Medicine**, v. 7, 2015.

BONNEAU, G.A.; PEDROZO, W.R.; BERG, G. Adiponectin and waist circumference as predictors of insulin-resistance in women. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 8, p. 3-7, 2014.

BOWE, J.E.; FRANKLIN, Z.J.; EVANS, A.C.H.; KING, A.J.; PERSAUD, S.J.; JONES, P.M. Assessing glucose homeostasis in rodent models. **Metabolic Phenotyping Guidelines**, v. 222, p. 13-25, 2014.

CARRASCOSA, J.M.; ANDRÉS, A.; ROS, M.; BOGÓNEZ, E.; ARRIBAS, C.; AGULLÓ, T.F.; SOLÍS, A.J.; GALLARDO, N.; MARTÍNEZ, C. Development of insulin resistance during aging: involvement of central processes and role of adipokines. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, p. 305-315, 2011.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, p. 419-425, 2002.

CASTRO, M.R.; VICTORIA, F.N.; OLIVEIRA, D.H.; JACOB, R.G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, p. 242-250, 2014.

CHEN, M.; LIU, Y.; JIN, J.; HE, Q. The efficacy and safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus patients with severe renal impairment: a metaanalysis. **Renal Failure**, v. 38, p. 581-587, 2016.

CHRUVATTIL, R.; BANERJEE, S.; NATH, S.; MACHHI, J.; KHARKWAL, G.; YADAV, M.R.; GUPTA, S. Dexamethasone Alters the Appetite Regulation via Induction of Hypothalamic Insulin Resistance in Rat Brain. **Molecular Neurobiology**, 2016.

CUI, B.; HU, Z.; ZHANG, Y.; HU, J.; YIN, W.; FENG, Y.; XIE, Q.; CHEN, G. Anthocyanins and flavonols are responsible for purple color of *Lablab purpureus* (L.) sweet pods. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 183-190, 2016.

CUMMINGS, B.P.; BREMER, A.A.; KIEFFER, T.; D'ALESSIO, D.; HAVER, P.J. Investigation of the mechanisms contributing to the compensatory increase in insulin secretion during dexamethasone-induced insulin resistance in rhesus macaques. **Journal of Endocrinology**, v. 216, p. 207-215, 2013.

DA CUNHA, F.A.B.; WACZUK, E.P.; DUARTE, A.E.; BARROS, L.M.; ELEKOFEHINTI, O.O.; MATIAS, E.F.F. et al. Cytotoxic and antioxidative potentials of ethanolic extract of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) leaves on human blood cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 614-621, 2016.

DEACON, C.F.; LEOVITZ, H.E. Comparative review of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors and sulphonylureas. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 18, p. 333-347, 2016.

DE SOUZA, B.P.; DA SILVA, E.D.; JURKIEWICZ, A.; JURKIEWICZ, N.H. Influence of acute treatment with sibutramine on the sympathetic neurotransmission of the Young rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology**, v. 738, p. 118-124, 2014.

DIONÍSIO, T.J.; LOUZADA, J.C.A.; VISCELLI, B.A.; DIONÍSIO, E.J.; MARTUSCELLI, A.M.; BAREL, M. et al. Aerobic Training Prevents Dexamethasone- Induced Peripheral Insulin Resistance. **Hormone and Metabolic Research**, v. 46, p. 484-489, 2014.

EDDOUKS, M.; BIDI, A.; BOUHALI, B.E.; HAJJI, L.; ZEGGWAGH, N.A. Antidiabetic plants improving insulin sensitivity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1197-1214, 2014

ERIKSSON, J.W.; BODEGARD, J.; NATHANSON, D.; THURESSON, M.; NYSTROM, T.; NORHAMMAR, A. Sulphonylurea compared to DPP-4 inhibitors in combination with metformin carries increased risk of severe hypoglycemia, cardiovascular events, and allcause mortality. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.117, p. 36-47, 2016.

FERREIRA, F.N.; CRISPIM, D.; CANANI, L.H.; GROSS, J.L.; DOS SANTOS, K.G. Association study of sorbitol dehydrogenase _888G>C polymorphism with type 2 diabetic retinopathy in Caucasian-Brazilians. **Experimental Eye Research**, v. 115, p. 140-143, 2013.

FONSECA, E.A.I. **Influência da obesidade e da resistência à insulina sobre o desenvolvimento tumoral: efeito da metformina**. 2010, 40 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós -Graduação em Farmacologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GONULLU, G.; ERSOY, C.; ERSOY, A.; EVRENSEL, T.; BASTURK, B.; KURT, E.; ORAL, B.; GOKGOZ, S.; MANAVOGLU, O. Relation between insulin resistance and serum concentrations of IL-6 and TNF- α in overweight or obese women with early stage breast câncer. **Cytokine**, v. 31, p. 264-269, 2005.

GUO, H.; LING, W. The update of anthocyanins on obesity and type 2 diabetes: Experimental evidence and clinical perspectives. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, p. 1-13, 2015.

GURLEY, F.G.; GRIESEL, B.A.; OLSON, A.L. Increased Skeletal Muscle Glut4 Expression in Obese Mice after Voluntary Wheel Running Exercise is Post-Transcriptional. **Diabetes**, p. 1-30, 2016.

GUSTAFSON, B.; HEDJAZIFAR, S.; GOGG, S.; HAMMARSTEDT, A.; SMITH, U. Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 26, p. 193-200, 2015.

HASANI-RANJBAR, S.; NAYEBI, N.; LARIJANI, B.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of the efficacy and safety of herbal medicines used in the treatment of obesity. **World Journal of Gastroenterology**, v.15, p. 3073-3085, 2009.

HOLZEROVÁ, E.; PROKISCH, H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 63, p. 16-20, 2015.

INGRAM, K. H.; HILL, H.; MOELLERING, D.R.; HILL, B.G.; CASTRO, C.L.; NEWCOMER, B. et al. Skeletal muscle lipid peroxidation and insulin resistance in humans. **The of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 97, p. 1182-1186, 2012.

KALYANASUNDAR, B.; PEREZ, C.I.; LUNA, A.; SOLORIO, J.; MORENO, M.G.; ELIAS, D.; SIMON, S.A.; GUTIERREZ, R. D1 and D2 antagonists reverse the effects of appetite suppressants on weight loss, food intake, locomotion, and rebalance spiking inhibition in the rat NAc shell. **Journal of Neurophysiology**, v. 114, p.585- 607, 2015.

KANECO, M.; NARUKAWA, M. Meta-analysis of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors use and cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 116, p. 171-182, 2016.

KARALLIEDDE, J.; GNUDI, L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, p. 206-213, 2014.

KOPPRASCH, S.; SRIRANGANT, D.; BERGMANN, S.; GRAESSLER, J.; SCHWARZ, P.E.H.; BORNSTEIN, S.R. Association between systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices – the PREDIAS study. **Clinical Endocrinology**, v. 84, p. 48-54, 2015.

KRAFT, T.E.; HRESKO, R.C.; HRUZ, P.W. Expression, purification, and functional characterization of the insulin-responsive facilitative glucose transporter GLUT4. **Protein Science**, v. 24, p. 2008-2019, 2015.

LAAKSO, M. Is Insulin Resistance a Feature of or a Primary Risk Factor for Cardiovascular Disease? **Current Diabetes Reports**, v. 15, p. 104-112, 2015.

LIRA JÚNIOR, J.S.; BEZERRA, J.E.F.; LEDERMAN, I.E. Repeatability of the production, number and weight of fruits of selections purple surinam cherry. **Acta Agronômica**, v. 59, p. 103-110, 2010.

LONNROTH, P.; SMITH, U. Aging Enhances the Insulin Resistance in Obesity through both Receptor and Postreceptor Alterations. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.62, p. 433-437, 1986.

LUCCA, L.; RODRIGUES, F.; JANTSCH, L.B.; KOBER, H.; NEME, W.S.; GALLARRETA, F.M.P.; GONÇALVES, T.L. Delta-aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress markers in preeclampsia. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 224–229, 2016.

MARTÍNEZ, B.B.; PEREIRA, A.C.C.; MUZETTI, J.H.; TELLES, F.P.; MUNDIM, F.G.L.; TEIXEIRA, M.A. Experimental model of glucocorticoid-induced

insulin resistance. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 3, p. 645-649, 2016.

MARY, J.K.S.; TRESINA, P.S.; MOHAN, V.R. Antioxidant, Antihyperlipidaemic and Antidiabetic Activity of *Eugenia Floccosa* Bedd Leaves in Alloxan Induced Diabetic Rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 3, p. 235-240, 2012.

MCCOOK-RUSSELL, K.P.; NAIR, M.G.; FACEY, P.C.; BOWEN-FORBES, C.S. Nutritional and nutraceutical comparison of Jamaican *Psidium cattleianum* (strawberry guava) and *Psidium guajava* (common guava) fruits. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1069-1073, 2012.

MICUCCI, C.; VALI, D.; MATAACCHIONE, G.; CATALANO, A. Current perspectives between metabolic syndrome and câncer. **Oncotarget**, v. 7, p. 38959-38972, 2016.

MILECH, A.; OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). Farmacêutica, 2016. Disponível em:
<http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf> Acessado em: 15 de fevereiro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/671-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-cronicas-nao-transmissiveis/11232-situacao-epidemiologica-dados>> Acessado em: 15 de fevereiro de 2017.

MOHSENIFAR, Z.; FERIDONI, M.J.; BAYAT, M.; FARAHANI, R.M.; BAYAT, S.; KHOSHVAGHTI, A. Histological and Biomechanical Analysis of the Effects of Streptozotocininduced Type One Diabetes Mellitus on Healing of Tentomized Achilles Tendons in Rats. **Foot and Ankle Surgery**, v. 20, p.186-191,2014.

MORAIS-BRAGA, M.F.B.; CARNEIRO, J.N.P.; MACHADO, A.J.T.; SALES, D.L.; SANTOS, A.T.L.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; MENEZES, I.R.A.; SOUZA, D.S.L.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 302-313, 2017.

NORRIS, J.M.; RICH, S.S. Genetics of Glucose Homeostasis Implications for Insulin Resistance and Metabolic Syndrome. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, p. 2091-2096, 2012.

PATEL, T.P.; RAWAL, K.; BAGCHI, A.K.; AKOLKAR, G.; BERNARDES, N.; DIAS, D.S.; GUPTA, S.; SINGAL, P.K. Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. **Heart Failure Reviews**, v. 21, p. 11-23, 2015.

PANDEY, J.; MAURYA, R.; RAYKHERA, R.; SRIVASTAVA, M.N.; YADAV, P.P.; TAMRAKAR, A.K. *Murraya koenigii* (L.) Spreng. Ameliorates insulin resistance in dexamethasone-treated mice by enhancing peripheral insulin sensitivity. **Journal**

of the **Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 2282–2288, 2014.

PARIKH, N.H.; PARIKH, P.K.; KOTHARI, C. Indigenous plant medicines for health care: treatment of Diabetes mellitus and hyperlipidemia. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, p. 335-344, 2014.

POP, A.; CLENCIU, D.; ANGHEL, M.; RADU, S.; SOCEA, B.; MOTA, E.; MOTA, M.; PANDURU, M.N. Insulin resistance is associated with all chronic complications in type 1 diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 8, p. 220-228, 2015.

RAFACHO, A.; GONÇALVES-NETO, L.M.; SANTOS-SILVA, J.C.; ALONSO-MAGDALENA, P.; MERINO, B.; TABOGA, S.R.; CARNEIRO, E.M.; BOSCHERO, A.C.; NADAL, A. and QUESADA, I. Pancreatic Alpha-Cell Dysfunction Contributes to the Disruption of Glucose Homeostasis and Compensatory Insulin Hypersecretion in Glucocorticoid-Treated Rats. **Plos One**, v. 9, n. 4, 2014

RAHAL, A.; KUMAR, A.; SINGH, V.; YADAV, B.; TIWARI, R.; CHAKRABORTY, S.; DHAMA, K. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-19, 2014.

RAVI, K.; SEKAR, D.S.; SUBRAMANIAN, S. Hypoglycemic Activity of Inorganic Constituents in *Eugenia jambolana* Seed on Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 99, p. 145-155, 2004.

RIBEIRO, A.B.; CHISTÉ, R.C.; FREITAS, M.; DA SILVA, A.F.; VISENTAINER, J.V.; FERNANDES, E. Psidium cattleianum fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140-148, 2014.

ROBERTS, C.K.; HEVENER, A.L.; BARNARD, R.J. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. **Comprehensive Physiology**, v. 3, p. 1-58, 2013

ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 85-91, 2006.

SALL, D.; WANG, J.; RASHKIN, M.; WELCH, M.; DROEGE, C.; SCHAUER, D. Orlistat-induced fulminant hepatic failure. **Clinical Obesity**, v. 4, p. 342-347, 2014.

SANKAR, P.; ZACHARIAH, B.; VICKNESHWARAN, V.; JACOB, S.E.; SRIDHAR, M.G. Amelioration of oxidative stress and insulin resistance by soy isoflavones (from Glycine max) in ovariectomized Wistar rats fed with high fat diet: The molecular mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 63, p. 67-75, 2015.

SCHUMACHER, N.S.G.; COLOMEU, T.C.; FIGUEIREDO, D.; CARVALHO, V.C.; CAZARIN, C.B.B.; PRADO, M.A.; MELETTI, L.M.M.; ZOLLNER, R.L. Identification and antioxidant activity of the extracts of *Eugenia uniflora* leaves. Characterization of the anti-inflammatory properties of aqueous extract on diabetes expression in an experimental model of spontaneous type 1 diabetes (NOD Mice).

Antioxidants, v. 4. p. 662-680, 2015.

SHARMA, S.B.; NASIR, A.; PRABHU, K.M.; MURTHY, P.S. Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 367–373, 2006.

SITI, H.N.; YUSOF, K.; KAMSIAH, J. The Role of Oxidative Stress, Antioxidants and Vascular Inflammation in Cardiovascular Disease (A Review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40-56, 2015.

SLIMEN, I.B.; NAJAR, T.; GHRAM, A.; DABBEBI, H.; MRAD, M.B.; ABDREBBAH, M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International Journal of Hyperthermia**, v. 30, p. 513-523, 2014.

SOUZA, J.B.; ROCHA, J.B.T.; NOGUEIRA, C.W.; BORGES, V.C.; KAISER, R.R.; MORSCH, V.M.; DRESSLER, V.L.; MARTINS, A.F.; FLORES, E.M.M.; SCHETINGER, M.R.C. Delta-aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 321-325, 2007.

SUNG, K.C.; PARK, H.Y.; KIM, M.J.; REAVEN, G. Metabolic markers associated with insulin resistance predict type 2 diabetes in Koreans with normal blood pressure or prehypertension. **Cardiovascular Diabetology**, v. 15, 2016.

TAG, H.; KALITA, P.; DWIVED, P.; DAS, A.K.; NAMSA, N.D. Herbal medicines used in the treatment of diabetes mellitus in Arunachal Himalaya, northeast, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 786-795, 2012.

TANAKA, S.I.; MIKI, T.; SHA, S.; HIRATA, K.I.; ISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances are associated with risk of coronary heart disease. **Journal of Atherosclerosis and Trombosis**, v. 18, p. 584- 591, 2011.

TANGVARASITTICHA, S.; PONGTHAISONG, S.; TANGVARASITTICHA, O. Tumor necrosis factor- α , interleukin-6, c-reactive protein levels and insulin resistance associated with type 2 diabetes in abdominal obesity women. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 31, p. 68-74, 2016.

TINKOV, A.A.; SINITSKII, A.I.; POPOVA, E.V.; NEMERESHINA, O.N.; GATIATULINA, E.R.; SKALNAYA, M.G.; SKALNY, A.V.; NIKONOROV, A.A. Alteration of local adipose tissue trace element homeostasis as a possible mechanism of obesity-related insulin resistance. **Medical hypotheses**, v. 85, p. 343- 347, 2015.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, p. 355-344, 2003.

WAJCHENBERG, B.L. Disfunção endotelial no diabetes tipo 2. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 46, p. 514-519, 2002.

WEISHEIMER, N.; COSTA FILHO, P.F.; NEVES, R.P.C.; SOUSA, R.M.; PINTO, D.S.; LEMOS, V.M. Fitoterapia como alternativa terapêutica no combate à obesidade. **Revista Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 13, p. 103-111, 2015.

WEN, X.; WU, J.; WANG, F.; LIU, B.; HUANG, C.; WEI, Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 402-410, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death (2012)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>> Acessado em: 08 de janeiro de 2017.

WRITING, D.R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 94, p. 311-321, 2011.

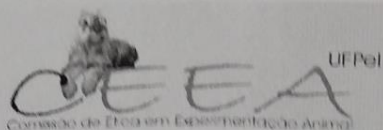
Xu, K.K.; Yang, W.J.; Tian, Y.; Wu, Y.B.; Wang, J.J.; Insulin signaling pathway in the oriental fruit fly: The role of insulin receptor substrate in ovarian development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 2016, p. 125-133, 2014.

YU, H.; ZHENG, L.; XU, L.; YIN, L.; LIN, Y.; LI, H.; LIU, K.; PENG, J. Potent Effects of the Total Saponins from *Dioscorea nipponica* Makino Against Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes Mellitus in Rats. **Phytoterapy Research**, v.29, p. 228-240, 2015.

ZEIGERER, A.; MCBRAYER, M.K.; MCGRAW, T.E. Insulin stimulation of GLUT4 exocytosis, but not its inhibition of endocytosis, is dependent on RabGAP AS160. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, p. 4406-4415, 2004.

ZHAO, L.; FU, Z.; WU, J.; AYLOR, K.W.; BARRET, E.J.; CAO, W.; LIU, Z. Globular adiponectin ameliorates metabolic insulin resistance via AMPK-mediated restoration of microvascular insulin responses. **The Journal of Physiology**, v. 593, p. 4067- 4079, 2015.

ANEXO



Pelotas, 16 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Prof. Francieli Moro Stefanello

Bioquímica - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Senhora Professora:

A CEEA analisou a solicitação o projeto intitulado: "**Avaliação das atividades antioxidante, hipocolesterolêmica e/ou hipoglicemiante de produtos naturais**", processo nº 23110.005747/2015-05, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 5747-2015).

Vigência do Projeto: 16/11/2015 a 10/11/2018

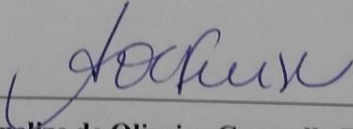
Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/ Wistar

Nº de animais: 329

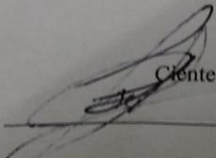
Idade: 60 dias

Sexo: Machos

Origem: Biotério Central – UFPel


M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável: 

Ciente em: 23/11/2015