

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.)
SKEELS SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ESTADO
REDOX DE RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR
DEXAMETASONA**

NATHALEE LIBERAL XAVIER RIBEIRO

São Luís
2017

NATHALEE LIBERAL XAVIER RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.)
SKEELS SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ESTADO
REDOX DE RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR
DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Gameiro Cappelli

São Luís

2017

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Liberal Xavier Ribeiro, Nathalee.

Avaliação dos efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* L.
Skeels sobre o perfil metabólico e estado redox de ratos com diabetes induzido
por dexametasona / Nathalee Liberal Xavier Ribeiro. - 2017.
56 f.

Coorientador(a): Ana Paula Gameiro Cappelli. Orientador(a): Antonio Marcus de
Andrade Paes. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão,
2017.

1. Atividade antioxidante. 2.Dexametasona. 3. Diabetes mellitus.
4.Secreção de insulina. 5. *Syzygium cumini*. I.de Andrade Paes, Antonio
Marcus. II.Gameiro Cappelli, Ana Paula. III. Título.

NATHALEE LIBERAL XAVIER RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Syzygium cumini* (L.)
SKEELS SOBRE O PERFIL METABÓLICO E ESTADO
REDOX DE RATOS COM DIABETES INDUZIDO POR
DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Júlio César de Oliveira
Universidade Federal do Mato Grosso

Prof. Dr. Nelo Eidy Zanchi
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dra. Maria do Socorro Cartagênes
Universidade Federal do Maranhão

*A mamãe e vovozinha, pelo amor e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente, por mais essa vitória na minha vida profissional e realização pessoal.

Ao meu orientador, mestre, amigo, pai e parceiro pela oportunidade da realização desse trabalho, pela orientação, por cada por puxão de orelha, por cada ensinamento, por me mandar estudar antes dos experimentos e por cada cerveja no final do expediente. Nenhuma paparicação com cafezinhos na hora do estresse ou bolinho de chocolate com Coca-Cola seriam suficientes para te agradecer. Amo você chefinho!

Aos meus pais, pelo amor e dedicação, em especial a minha mãe por ser um exemplo de mulher guerreira e por não medir esforços para que eu chegasse até aqui. Essa realização sempre foi para ti e por ti. Aos meus irmãos pela parceria e incentivo em todos os momentos. Amo vocês infinitamente.

A minha avó, mais conhecida como vovozinha, nada será suficiente pra descrever meu amor e minha gratidão por você.

Aos meus amigos pelo incentivo, pela amizade e por muitas vezes entenderem a minha ausência. Em especial, a Mairla e Débora, por estarem presentes na minha vida em todos os momentos. Essa vitória é nossa.

Ao Lefisio, minha família científica e de coração, por todo apoio e parceria ao longo desses anos. Tenho muito orgulho de fazer parte de equipe. Vocês são maravilhosos.

Ao Jonas e Mariana, a equipe do “pâncreas”, pela parceira e por todo apoio para realização desse trabalho. Vocês tornaram os dias mais leves e alegres.

A minha querida co-orientadora Ana Paula Cappelli pelo apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde, em especial a Professora Flávia Nascimento, pelas oportunidades e apoio.

A Universidade Federal do Maranhão e a Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão- FAPEMA

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
2.	Referencial teórico	3
2.1.	Aspectos biológicos das espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre	3
2.2.	Sistemas antioxidantes endógenos.....	5
2.3.	Estresse oxidativo	7
2.4.	Estresse Oxidativo e as doenças crônico-degenerativas	8
2.4.1.	Modelos de indução de diabetes por estresse oxidativo	9
2.5.	Papel dos antioxidantes na terapêutica anti-diagetogênica	11
2.5.1.	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels	11
2.6.	Justificativa	13
3.	Objetivos	15
3.1.	Objetivos gerais	15
3.2.	Objetivos específicos	15
4.	Materiais e métodos	16
4.1.	Material Botânico e preparo do extrato hidroalcoólico	16
4.2.	Animais e grupos experimentais	16
4.2.1.	Peso corporal	17
4.3.	Avaliações plasmáticas: glicemia, insulinemia e lipidograma	17
4.4.	Parâmetros hepáticos	18
4.5.	Teste de tolerância intraperitoneal à glicose	18
4.6.	Avaliação de resistência à insulina	18
4.7.	Avaliação da secreção estática de insulina em ilhotas isoladas.....	18

4.7.1.	Isolamento das ilhotas.....	19
4.7.2.	Secreção estática de insulina	19
4.8.	Preparo dos tecidos para a avaliação de atividade enzimática antioxidante.....	19
4.8.1.	Enzima superóxido dismutase	20
4.8.2.	Enzima catalase	20
4.8.3.	Enzima glutathione peroxidase.....	20
4.9.	Parâmetros oxidativos	21
4.9.1.	Hidroperóxidos totais	21
4.10.	Análise Estatística dos Resultados	21
5.	Resultados	22
5.1.	Efeitos do EHSc sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos.....	22
5.2.	Efeito do EHSc sobre os parâmetros bioquímicos séricos	23
5.3.	Efeito do EHSc sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos	24
5.4.	Efeito do EHSc sobre a tolerância a glicose, resistência à insulina e atividade secretória do pâncreas endócrino	25
5.5.	Efeito do EHSc sobre o sistema de defesa antioxidante e parâmetros oxidativos	28
6.	Discussão	30
7.	Considerações Finais	34
8.	Referências	35
	Anexos	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

CAT	Catalase
DNA	cido desoxirribonucleico
DM2	Diabetes mellitus do tipo 2
ER	Retículo endoplasmático
ERE	Espécies reativas de enxofre
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
GCs	Glicocorticoides
GLUT2	Transportador de glicose 2
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione dissulfeto
IsoLGs	Isolevuglandinas
EHSc	Extrato hidroalcolico de <i>Syzygium cumini</i>
HNE	4-hidroxi-trans 2,3 nonenal
H₂O	gua
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MAFA	Fator homólogo de oncogene de fibrosarcoma proto-oncogene
MDA	Malonildialdedo

NADP	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NOX	NADPH oxidase
ONE	4- oxononenal
Pdx1	Fator de transcrição pancreático e duodenal
PRx	Peroxirredoxina 1
RNAm	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TRx	Tiorredoxina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação e nomenclatura das principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Tabela adaptada -(Halliwell e Gutteridge, 2015)..... 4

Tabela 2. Parâmetros morfométricos de ratos tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini*, dexametasona e seus controles 24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de ERO celular, compostos por radicais e não radicais, gerados principalmente: matriz mitocondrial (MITO), retículo endoplasmático (ER) e complexo NOX (NOX). As principais enzimas antioxidantes e os processos celulares para combater EROs. (Figura adaptada - (Ye <i>et al.</i> , 2015)	7
Figura 2. Fluxograma do protocolo de indução com dexametasona e tratamento do EHSc	17
Figura 3. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre o delta de peso corporal de ratos.....	23
Figura 4. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre os parâmetros bioquímicos	25
Figura 5. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre os parâmetros hepáticos	26
Figura 6. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium. cumini</i> sobre a tolerância a glicose	27
Figura 7. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre a resistência à insulina e atividade secretória do pâncreas endócrino	28
Figura 8. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Syzygium cumini</i> sobre a secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas.....	29
Figura 9. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre atividade das enzimas antioxidantes	30
Figura 10. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do <i>Syzygium cumini</i> sobre os parâmetros oxidativos	30
Figura 11. Ação antioxidante sérica do extrato hidroalcoólico de <i>Syzygium cumini</i>	34

RESUMO

O estresse oxidativo tem sido associado a diversas patologias crônico-degenerativas, dentre elas o *diabetes mellitus* do tipo 2. Por ser uma doença endêmica, há busca constante por novas drogas anti-diabéticas, bem como tratamentos coadjuvantes. Nesse contexto, destaca-se a espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels, conhecida popularmente como jambolão e tradicionalmente utilizada para controle do diabetes. Com isto, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico da folha de *Syzygium cumini* (EHSc) sobre o perfil metabólico e estado redox de ratos com diabetes induzido por dexametasona. Ratos Wistar (machos, 90 dias) foram divididos em três grupos experimentais: CTR – grupo controle (NaCl 0,9%; v.o), DEX - grupo diabético induzido com dexametasona (1 mg/Kg/dia; i.p.) e EHSc - grupo diabético tratado com EHSc (500 mg/Kg/dia; v.o). Os animais foram acompanhados por 10 dias, sendo a indução realizada a partir do 6º dia, enquanto o tratamento com EHSc foi realizado ao longo dos 10 dias. Antes da indução com a dexametasona os grupos CTR e DEX apresentaram ganho de peso semelhante e grupo DEX+EHSc perda de peso. Após indução com a dexametasona, os animais DEX e DEX+EHSc tiveram perda de peso acentuada. O coxim retroperitoneal diminuiu em 41,3% nos animais DEX e 34,2% nos animais DEX+EHSc em relação ao CTR, $p < 0,05$. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os pesos relativos dos demais órgãos avaliados. Houve aumento da glicemia em jejum no grupo DEX em 34,1 %, em relação ao grupo CTR. O tratamento com EHSc atenuou o efeito hiperglicemiante da dexametasona, uma vez que, a glicemia em jejum do grupo DEX+EHSc foi reduzida. Houve aumento de 142,5% do triglicerídeo sérico no grupo DEX em relação ao CTR, $p < 0,05$. O EHSc atenuou o efeito hipertrigliceridemiante em 34,4% em relação ao grupo CTR, $p < 0,05$. Os níveis de insulina sérica dos animais do grupo DEX foi cerca de 10 vezes superior àqueles do grupo CTR, $p < 0,05$. O tratamento com EHSc amenizou a insulinemia do grupo DEX+EHSc. Em condições basais (glicose 5,6 mM) as ilhotas pancreáticas dos animais DEX e DEX+EHSc apresentaram hipersecreção de insulina, porém, em condições de hiperglicemia (glicose 16,7 mM), as ilhotas dos animais DEX+EHSc apresentaram reversão da hipersecreção induzida por dexametasona. A dexametasona aumentou em 106,1% no conteúdo de triglicerídeos hepáticos em relação ao CTR, enquanto o tratamento com EHSc preveniu totalmente este acúmulo. A atividade sérica da superóxido dismutase nos animais DEX foi aproximadamente 3 vezes superior aos CTR, sendo que, houve aumento semelhante no grupo. A atividade da catalase também estava aumentada nos animais DEX, quando comparados aos CTR, sendo marginalmente reduzida nos DEX+EHSc. A atividade da glutathione peroxidase não variou entre os grupos. Para a determinação dos danos oxidativos decorrentes do estresse oxidativo, quantificou-se a formação de hidroperóxidos séricos, sendo observado aumento de 27,2% na quantificação destes produtos no soro dos animais DEX, efeito não observado nos DEX+EHSc. Nossos resultados corroboram o EHSc como uma fonte potencial de compostos antioxidantes que melhoraram as respostas aos danos oxidativos, bem como a secreção de insulina e outros parâmetros metabólicos.

Palavras-chave: *Syzygium cumini*; *Diabetes Mellitus*; dexametasona; secreção de insulina; atividade antioxidante.

ABSTRACT

Oxidative stress has been associated to many chronic-degenerative pathologies, including type 2 diabetes mellitus. As it is an endemic disease, there is a constant search for new anti-diabetic drugs, as well as adjuvant treatments. In this context, the plant species *Syzygium cumini* (L.) Skeels stands out, popularly known as “jambolão” and traditionally used to control diabetes. Therefore, this study aims to assess the effects of the hydroalcoholic extract of the *Syzygium cumini* leaf (EHSc) on the metabolic profile and redox status of rats with dexamethasone-induced diabetes. Male Wistar rats were divided into three experimental groups: CTR - control group (NaCl 0.9%, vo), DEX - diabetic group induced with dexamethasone (1 mg / kg / day, ip) and EHSc - group treated with EHSc (500 mg / kg / day; vo). Animals were accompanied for 10 days, and the induction was performed from the 6th day, while EHSc treatment was performed over 10 days. Before diabetes dexamethasone-induction, CTR and DEX groups showed similar weight gain, and DEX + EHSc group, weight loss. After induction with dexamethasone, DEX and DEX + EHSc animals had marked weight loss. Retroperitoneal fat pad decreased by 41.3% in DEX and 34.2% in DEX + EHSc animals, as compared to the CTR, $p < 0.05$. However, no statistically significant difference observed between relative weights from other organs evaluated. There was an increase in fasting glucose in the DEX group by 34.1%, in relation to the CTR group. Treatment with EHSc attenuated the hyperglycemic effect of dexamethasone, since the fasting glucose of the DEX + EHSc group has reduced. There was an increase of 142.5% of the serum triglyceride in DEX group in relation to CTR, $p < 0.05$. EHSc treatment attenuated the hypertriglyceridemic effect by 34.4%, as compared to the CTR group, $p < 0.05$. The serum insulin levels of DEX animals were about 10-fold higher than CTR ones, $p < 0.05$. EHSc treatment improved insulinemia in DEX + EHSc group. Under basal conditions (glucose 5.6 mM), pancreatic islets of DEX and DEX + EHSc animals presented hypersecretion of insulin. However, under conditions of hyperglycemia (glucose 16.7 mM), islets from DEX + EHSc animals showed a reversal of dexamethasone-induced hypersecretion. Dexamethasone increased hepatic triglyceride content by 106.1% in comparison to CTR, whereas EHSc treatment totally prevented this accumulation. Serum activity of superoxide dismutase in DEX animals was around 3-fold higher than CTR, and there was a similar increase in DEX + EHSc group. Catalase activity enhanced in DEX animals, in relation to CTR, and it was reduced in the DEX + EHSc. The activity of glutathione peroxidase did not vary between groups. For determining oxidative damages due to oxidative stress, serum hydroperoxide formation was assessed and it revealed an increase of 27.2% of these products in serum of DEX animals, an effect not observed in DEX + EHSc. Our results corroborate the EHSc as a potential source of antioxidant compounds that improves responses to oxidative damage as well as insulin secretion and other metabolic parameters. Keywords:

Syzygium cumini; Diabetes Mellitus; dexamethasone; insulin secretion; antioxidant activity.

1. Introdução

A vida aeróbica é caracterizada por uma produção contínua de espécies reativas, tais como aquelas de oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) e enxofre (ERE) (Halliwell e Gutteridge, 2015). Essas espécies desempenham um papel duplo, uma vez que, podem ser benéficas ou prejudiciais para os seres vivos. Em baixas a moderadas concentrações, as espécies reativas participam das respostas celulares, como por exemplo, anoxia em defesa contra agentes infecciosos, sinalização celular e indução de respostas mitogênicas (Valko *et al.*, 2007). Porém, em condições em que há produção elevada, a alta concentração destas espécies torna-se prejudicial causando danos biológicos (Ye *et al.*, 2015).

O aumento de espécies reativas no organismo é combatido por antioxidantes de origem endógena ou exógena, oriundos da dieta. De acordo com Halliwell e Barry (2015) “antioxidantes é qualquer substância que, quando presentes em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo”. Os antioxidantes endógenos, podem atuar como enzimas, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) ou glutational peroxidase (GPx) ou, de forma não enzimática, como por exemplo a glutational reduzida (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro dentre outras. Outra fonte antioxidante utilizada pelo organismos são os provenientes da dieta como a vitamina E, ácido ascórbico, β -caroteno e compostos fenólicos, principalmente os flavonoides e polifenóis (Kalyanaraman, 2013; Pisoschi e Pop, 2015).

Os produtos pró-oxidantes (ERO, ERN e ERE) são contrabalançados pelos mecanismos de defesa antioxidante celular nas condições fisiológicas normais. O desequilíbrio entre a formação de espécies reativas e os sistemas antioxidantes leva à instauração de um estado de estresse oxidativo, tendo como consequência o aumento de danos a componentes celulares, tais como como, lipídios, proteínas e DNA (Czerska *et al.*, 2015). O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental em várias condições patológicas, incluindo doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, obesidade e o diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) (Ogura e Shimosawa, 2014; Newsholme *et al.*, 2016).

Apesar das grandes inovações terapêuticas em DM2 e as abordagens farmacológicas existentes, a busca de novas moléculas tem sido estendida aos medicamentos fitoterápicos (Sharma *et al.*, 2012). Estudos demonstram que o uso regular de compostos fenólicos, fitoesteróis e terpenóides, exerce efeito benéfico na prevenção de doenças, regulando várias vias celulares e moleculares, como por exemplo a inflamação, modulação redox, desordens metabólicas, apoptose dentre outras (Angeloni *et al.*, 2012). Os polifenóis são descritos como moléculas bioativas e possuem uma gama de papéis protetores, como hipolipidêmicos, antiproliferativos, anti-inflamatórios e antioxidantes (Upadhyay e Dixit, 2015; Losada-Barreiro e Bravo-Díaz, 2017).

Dentre as espécies ricas em polifenóis, o *Syzygium cumini* (L.) Skeels (sinonímia *Eugenia jambolana*), popularmente conhecido como "jambolão", destaca-se como uma das plantas medicinais mais utilizadas para controle de diabetes mellitus no Brasil (Teixeira *et al.*, 2000), a ela são atribuídas diversas propriedades medicinais tais como: atividade antihiperglicemiante, antidiarréica, antimicrobiana, antioxidante, hipolipemiante, cardioprotetora, hepatoprotetora, dentre outras (Ayyanar e Subash-Babu, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Mohamed *et al.*, 2013; Chagas *et al.*, 2015).

Diversos estudos apontam o *Syzygium cumini* como um potente agente terapêutico para o tratamento do DM2 e suas comorbidades (Ayyanar *et al.*, 2013). Estudos publicados em nosso grupo demonstram os benefícios cardiometabólicos da espécie, além da ação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* sobre os parâmetros metabólicos, em especial a melhora da resistência à insulina e dislipidemia em ratos obesos (Chagas *et al.*, 2015). Estes efeitos benéficos podem ser atribuídos aos compostos fenólicos presentes na espécie vegetal. No entanto, ainda não está claro se as atividades antioxidantes do *Syzygium cumini* estão envolvidas nestas alterações.

2. Referencial teórico

2.1. Aspectos biológicos das espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre

As espécies reativas, radicalares ou não, são formadas durante processos fisiológicos de oxidação, podendo ser produzidas no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas celulares (Lushchak, 2015). De acordo com Halliwell & Gutteridge (2015) são moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, o que faz com que essas moléculas sejam altamente instáveis e muito reativas. Baixas concentrações (fisiológicas) de espécies reativas são necessárias para a sinalização celular, processos de fagocitose e também estão envolvidos na síntese de proteínas (Pisoschi e Pop, 2015). No entanto, altas concentrações levam a uma condição de estresse, causando um desbalanço redox que resulta em danos aos constituintes celulares críticos como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios, comprometendo o funcionamento da célula e acarretando em apoptose precoce ou necrose (Ogura e Shimosawa, 2014).

As duas principais substâncias geradoras de espécies reativas presentes na natureza são o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO^*). Durante o metabolismo, tais substâncias podem gerar componentes altamente instáveis chamados de espécies reativas, estas são moléculas ou íons derivados do oxigênio (ERO), nitrogênio (ERN) ou enxofre (ERE) produzidas através da fosforilação oxidativa mitocondrial e peroxissomal (Tabela 1) (Lushchak, 2015). A mitocôndria é a principal fonte endógena na produção de ERO durante a produção de energia na etapa de fosforilação oxidativa no transporte de elétrons. Além das mitocôndrias, existem vários outros sítios de geração de ERO e ERE, incluindo NADPH oxidases (NOXs), citocromo P450, xantina oxidase, óxido nítrico sintase e peroxissomos (Halliwell e Gutteridge, 2015).

ERN e ERE são formadas por diferentes processos endógenos e exógenos. As ERE são formadas quando um grupo de tiol ($-SH$) reage com radicais de oxigênio ou metais de transição (Winterbourn, 2015). As ERN, são formadas a partir da reação de NO^* , sendo este sintetizado a partir do grupo guanidina da L-arginina por uma família

de enzimas denominadas óxido nítrico sintases. A geração simultânea de $\text{NO}^\bullet$ e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) favorece a produção de um oxidante forte, o ânion peroxinitrito (ONOO^-) (Modun *et al.*, 2014).

Espécies Reativas	
Radicais Livres	Não Radicais
Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	
Superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxil ($\text{OH}^\bullet$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Hidroperoxil ($\text{HO}_2^\bullet$)	Ozônio (O_3)
Peroxil ($\text{RO}_2^\bullet$)	Oxigênio <i>Singlet</i> ($^1\text{O}_2$)
Alcoxil ($\text{RO}^\bullet$)	Peróxidos Orgânicos (ROOH)
Carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet-}$)	Peroxinitrito (ONOO^-)
Dióxido de Carbono ($\text{CO}_2^\bullet$)	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN)	
Óxido Nítrico ($\text{NO}^\bullet$)	Ácido Nitroso (HNO_2)
Dióxido de Nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$)	Cátion Nitroxil (NO^+)
	Ânion Nitroxil (NO^-)
	Peroxinitrito (ONOO^-)
	Ácido Peroxinitroso (ONOOH)
Espécies Reativas de Enxofre (ERE)	
Tiil ($\text{RE}^\bullet$)	
Semiquinonas ($\text{EQ}^{\bullet-}$)	
Glutationil ($\text{GE}^\bullet$)	
Cisteinil ($\text{Cis}^\bullet$)	

Tabela 1. Classificação e nomenclatura das principais espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre. Tabela adaptada - (Halliwell e Gutteridge, 2015).

Estudos demonstram que as proteínas são susceptíveis às reações de oxidorredução. Entre os danos finais estão as alterações de atividade enzimáticas, mudanças nas estruturas terciárias, degradação, fragmentação e funções celulares alteradas (Cai e Yan, 2013). As ERO causam modificações oxidativas reversíveis em

proteínas, causando modificações na cisteína refletindo no estado redox, bem como estão envolvidos na cascata de sinalização celular. Danos irreversíveis causados pela oxidação em proteínas resultam em carbonilação e nitração de tirosinas, sendo utilizados como biomarcadores para a avaliação do estresse oxidativo em doenças e no envelhecimento (Rao e Møller, 2011; Gupta *et al.*, 2014).

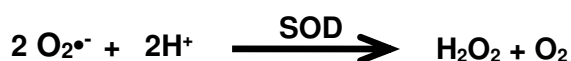
Os lipídeos, por sua vez, são mais susceptíveis às modificações oxidativas. As reações entre as ERO e lipídeos insaturados são conhecidas como peroxidação lipídica, tendo como principais consequências as alterações das propriedades físicas e químicas da membrana, alterando sua fluidez e permeabilidade, com riscos de ruptura de membrana celular e organelas e consequentemente morte celular (Guéraud *et al.*, 2010). Os principais produtos primários de peroxidação lipídica são os hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Diversos aldeídos podem ser formados como produtos secundários durante a peroxidação de lipídica, incluindo malondialdeído (MDA), acroleína, 4-hidroxi-trans 2,3 nonenal (HNE), 4- oxononenal (ONE) e isolevuglandinas (IsoLGs) (Guo *et al.*, 2012).

2.2. Sistemas antioxidantes endógenos

Naturalmente o nosso organismo desenvolve mecanismos protetores contra o dano oxidativo induzido por essas espécies reativas através de sistemas enzimáticos e não-enzimáticos (Sinha *et al.*, 2013). O sistema de defesa antioxidante é formado por dois grupos de substâncias: A) enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), além de outras proteínas antioxidantes, incluindo heme oxigenase-1 e proteínas redox, tais como tioredoxinas (TRx), peroxiredoxinas e glutaredoxinas (Birben *et al.*, 2012) e B) componentes antioxidantes não-enzimáticos, alguns produzidos pelo próprio organismo, tais como albumina, bilirrubina, ácido úrico e outros obtidos através da dieta, como as vitaminas A, C e E, β -caroteno, ácido α lipoíco, flavonoides, minerais antioxidantes (manganês, selênio e zinco) e cofatores (ácido fólico, vitaminas B₁, B₂, B₆ e B₁₂) (Prentki e Madiraju, 2012; Pisoschi e Pop, 2015). A ação antioxidante não-

enzimática atua de forma sinérgica com as enzimas antioxidantes contra os diferentes tipos de espécies reativas (Pisoschi e Pop, 2015).

A enzima antioxidante que catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 é conhecida como SOD. As principais isoformas de SOD são: a cobre-zinco (Cu/ZnSOD ou SOD1) localizada no citosol e a manganês (MnSOD ou SOD2) localizada na mitocôndria (Ye *et al.*, 2015).



Reação: Reação de dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2

O H_2O_2 pode se difundir facilmente entre as células e é pouco reativo, mas em concentrações micromolares pode ser citotóxico. O H_2O_2 é removido do meio intracelular por enzimas como CAT e peroxidases, como a GPx. O H_2O_2 que é produzido pela ação das SOD ou ação de oxidases, como a xantina oxidase, e é reduzida a água por catalase e o GPx. A catalase é uma ferrihemoenzima presente principalmente no citosol cuja função principal é a remoção de elevadas quantidades de H_2O_2 (Birben *et al.*, 2012).



Reação: Reação de dismutação do H_2O_2 formando água e oxigênio.

As peroxidases são enzimas que utilizam uma variedade de redutores celulares para inativar peróxidos, dentre as quais, em mamíferos, as principais são as GPx que removem o H_2O_2 mesmo em baixas concentrações (Pisoschi e Pop, 2015). As moléculas doadoras de elétrons nesse caso são pequenas moléculas, como as glutathiona, sendo necessárias duas moléculas para a remoção de uma molécula de H_2O_2 . Para que ocorra essa reação é necessária a participação de NADPH, o qual é responsável pela regeneração da GSSG para a forma reduzida (GSH). O NADPH também mantém a CAT na forma ativa e é utilizado como cofator por TRX e GR, que converte o GSSG em GSH, um co-substrato para a GPx (Birben *et al.*, 2012).

2.3. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de ERO e ERN excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo da célula, tendo como consequência o aumento de danos aos componentes celulares. Essas ações deletérias aumentam os níveis de peroxidação lipídica, a carbonilação em proteínas e até danos ao DNA intracelular, podendo prejudicar o metabolismo intracelular, comprometendo o funcionamento da célula e acarretando em apoptose precoce ou necrose (Cao *et al.*, 1993; Radák *et al.*, 1999; Czerska *et al.*, 2015).

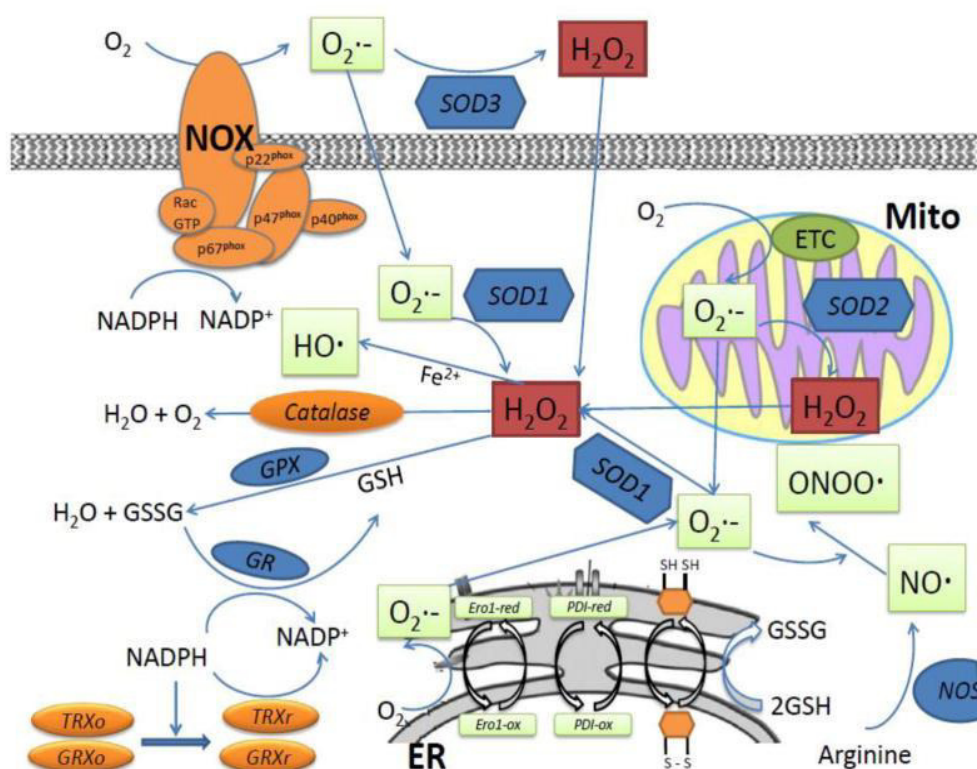


Figura 1. Formação de ERO celular, compostos por radicais e não radicais, gerados principalmente: matriz mitocondrial (MITO), retículo endoplasmático (ER) e complexo NOX (NOX). As principais enzimas antioxidantes e os processos celulares para combater EROs. (Figura adaptada - (Ye *et al.*, 2015).

Vários fatores influenciam a susceptibilidade ao estresse oxidativo, afetando o status de antioxidantes ou a geração de ERO. Tanto fontes exógenas como endógenas contribuem para essa formação de ERO/ERN intracelular. As principais

fontes exógenas são a radiação UV, raio X, raios gama, poluentes atmosféricos, medicamentos, produtos químicos e dietas (Birben *et al.*, 2012).

A principal fonte endógena de ERO celular é a mitocôndria, onde o O_2^- é gerado através do vazamento de elétrons do complexo I e III da cadeia de transportes de elétrons. Peroxissomos e microssomas são fontes de ERO, principalmente na formação de H_2O_2 . Outras fontes de geração de ERO endógenos incluem o NADPH oxidase que está associada a membrana, citocromo C oxidase e xantina oxidase. A presença de metais redox ativos como o Fe e Cu também contribui para a geração de ERO. Na presença de Fe (II) e (III), ocorre a geração de OH por reação de Fenton ou Haber- Weiss (Halliwell e Gutteridge, 2015).

2.4. Estresse Oxidativo e as doenças crônico-degenerativas.

O estresse oxidativo desempenha um papel patológico importante no desenvolvimento de várias doenças inflamatórias e autoimunes, assim como em doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, obesidade e diabetes mellitus (Essick *et al.*, 2013; Wu e Yan, 2015; Losada-Barreiro e Bravo-Díaz, 2017). Estudos epidemiológicos, clínicos e em animais demonstram que a obesidade está acoplada com alterações no estado redox e metabólico (Savini *et al.*, 2013).

Na obesidade crônica, o estresse oxidativo sistêmico faz parte das numerosas alterações biológicas relatadas, podendo ser uma consequência, mas também um gatilho da obesidade. Estudos em cultura de células e em animais demonstraram que o estresse oxidativo aumenta a proliferação de pré-adipócitos, a diferenciação de adipócitos e o tamanho dos adipócitos maduro (Higuchi *et al.*, 2012; Le Lay *et al.*, 2014). O estresse oxidativo crônico e a inflamação causadas pela obesidade são os fatores subjacentes que levam ao desenvolvimento de patologias como distúrbios metabólicos, doenças cardiovasculares, aumento da resistência à insulina e DM2 (Le Lay *et al.*, 2014).

O DM2 é a forma verificada em 90 a 95% dos casos de diabetes e é frequentemente associado com hiperinsulinemia basal, disfunção na biossíntese e

secreção de insulina, metabolismo anormal de carboidratos, proteínas e lipídeos. É considerado um distúrbio metabólico complexo resultante da diminuição progressiva da secreção de insulina pelas células β e aumento da resistência à insulina em tecidos periféricos, resultando em hiperglicemia (Tiwari *et al.*, 2013).

No DM2, a disfunção da célula β ocorrerá antes da hiperglicemia se desenvolver. Com o aumento nos níveis de glicose, lipídeos e vários outros fatores inflamatórios interagem ao nível da ilhota promovendo perturbação na homeostasia. Essas alterações estão ligadas a ativação da NOX e consequentemente um aumento da produção de ERO (Morgan *et al.*, 2007). A célula β possui uma alta sensibilidade ao ataque oxidativo, tornando-a mais suscetível a morte celular precoce, especialmente por estarem continuamente expostas a níveis excessivos de geração de ERO mitocondrial, além de espécies reativas adicionais decorrentes do aumento da atividade da NADPH-oxidase de células β e ineficiência dos agentes de defesa antioxidante (Newsholme *et al.*, 2007; Rains e Jain, 2011).

Para neutralizar as ERO, as células são equipadas com mecanismos de defesa antioxidantes que são capazes de combater o estresse oxidativo. Em estudo realizado por Lenzen *et al.* (1996), observou-se que de forma negativa, em comparação a outros tecidos, a célula β têm menor abundância de enzimas de defesa antioxidante. Estas células não expressam CAT e expressam baixos níveis de GPx. Além disso, o aumento do estresse oxidativo gerado pelas ERO diminuem a expressão de RNAm através da inativação dos fatores de transcrição específicos de células β , tais como o Fator de transcrição pancreático e duodenal (PDX1) e o Fator homólogo de oncogene de fibrosarcoma proto-oncogene (MafA), tendo como principal consequência a redução da síntese de proinsulina, bem como a inativação de múltiplos genes necessários para a diferenciação celular, proliferação e sobrevivência dessas células (Kaneto e Matsuoka, 2015).

2.4.1. Modelos de indução de diabetes por estresse oxidativo

Historicamente os modelos animais têm desempenhado um papel crítico na exploração da fisiopatologia de doenças, avaliação de novos agentes terapêuticos e

tratamentos *in vivo*. Os modelos de indução do DM2 são caracterizados pela resistência à insulina ou pela falência das células β , mediado por diversos fatores, dentre eles farmacológicos, químicos e por estresse oxidativo (King, 2012).

Vários modelos não-genéticos foram desenvolvidos nas últimas três décadas para a investigação do DM2, incluindo modelos químicos, tais como aloxana e estreptozotocina (STZ). Ambos os produtos químicos são utilizados como análogos citotóxicos de glicose que tendem a acumular-se em células β pancreáticas através do transportador de glicose 2 (GLUT2) (Lenzen, 2008). Nath *et al.* (2017) mostraram que murinos apresentaram alterações significativas no perfil lipídico, tolerância à glicose, resistência à insulina, hiperglicemia moderada, aumento de ácidos graxos livre após três semanas de ingestão de dieta rica em gorduras seguido de doses de STZ (40mg/Kg de peso corporal). Estes resultados indicam que, além de sua utilidade como modelo de etiologia da doença, este modelo também poderia ser utilizado para elucidar o papel de hormônios relacionados ao DM2, bem como investigar as complicações diabéticas.

Glicocorticoides sintéticos (GCs), como a dexametasona e prednisona, são utilizados na clínica devido ao seu potencial anti-inflamatório, antialérgico e imunossupressor. Apesar de ser amplamente utilizado na prática médica os glicocorticoides possuem efeitos metabólicos adversos (Perez *et al.*, 2014). A exposição prolongada e/ou altas doses de GCs é conhecida por promover um desequilíbrio na homeostase da glicose, aumentando resistência à insulina (RI), hiperinsulinemia e intolerância à glicose, caracterizando um modelo de indução do DM2 (Protzek *et al.*, 2016).

Os GCs são tidos como diabetogênicos por causar diminuição da captação de glicose pelos tecidos e por aumentar a produção de glicose hepática, resultando em resistência à insulina, levando ao DM2, forma predominante em humanos. Essa condição imposta pelo tratamento com glicocorticoides é caracterizada por apresentar normoglicemia ou hiperglicemia de jejum moderada associada a hiperinsulinemia (Rafacho *et al.*, 2014). A hiperinsulinemia em indivíduos tratados com dexametasona é resultado de um mecanismo compensatório do pâncreas endócrino contra a resistência à insulina. Estudos demonstram que ilhotas de ratos tratados com

dexametasona desenvolvem várias adaptações que aumentam a capacidade secretória, bem como o aumento na proliferação das células β (Rafacho *et al.*, 2010).

Estudos demonstram que níveis elevados de GCs afetam o equilíbrio redox tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os efeitos pro-oxidantes dos GCs é mista, uma vez que este pode aumentar o dano oxidativo ou, por outro lado iniciar a regulação das defesas antioxidantes, reduzindo a produção de espécies reativas (Costantini *et al.*, 2011).

2.5. Papel dos antioxidantes na terapêutica anti-diagetogênica

Muitos agentes terapêuticos foram utilizados para o tratamento do DM2 antes da descoberta da insulina sintética e várias plantas eram utilizadas devido a sua atividade antidiabética. Derivados de plantas foram utilizados na medicina tradicional em todo o mundo desde o tempo antigo até a atualidade (Li *et al.*, 2014). Os polifenóis constituem um dos grupos mais importantes de metabolitos secundários das plantas. Eles são amplamente distribuídos no reino vegetal e podem ser obtidos diretamente de plantas e outros alimentos ricos em antioxidantes ou suplementos de drogas, ganhando atenção em todo o mundo como nutracêuticos na prevenção de várias doenças, dentre elas o DM2. Os polifenóis são excelentes antioxidantes, pois possuem a capacidade de doar hidrogênio que são aceitos por radicais reativos para produzir espécies menos reativas (Angeloni *et al.*, 2012). Uma escolha cuidadosa das características físico-químicas dos polifenóis é crucial porque afeta fortemente sua biodisponibilidade e reatividade química contra ERO (Upadhyay e Dixit, 2015).

2.5.1. *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Syzygium cumini (L.) Skeels (sinonímia *Eugenia jambolana*), popularmente conhecido como "jambolão", é uma planta medicinal de origem indiana que pertence à família Myrtaceae (Tripathi e Kohli, 2014). O gênero compreende cerca de 1100 espécies e tem uma faixa nativa das regiões dos trópicos particularmente a Índia, Tailândia, Filipinas e Madagascar (Ayyanar e Subash-Babu, 2012). Diferentes partes da planta, como folhas, cascas, raiz, frutos, flores e sementes são preparadas e

administradas de acordo com as suas propriedades: atividade antihiperglicemiante, antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante, hipolipemiante, cardioprotetora, hepatoprotetora, dentre outras (Mohamed *et al.*, 2013; Srivastava e Chandra, 2013).

Estudos experimentais e clínicos propuseram o *Syzygium cumini* como um novo agente terapêutico demonstrando que as diferentes partes da planta são utilizadas para o controle do diabetes (Ayyanar *et al.*, 2013). Nas cascas observa-se atividades antidiabéticas através de mecanismos pancreáticos e extra pancreáticos (Tripathi e Kohli, 2014). Nas sementes destaca-se um efeito protetor nas células β evitando sua necrose frente a indução por aloxano (Singh e Gupta, 2007). Estudos reforçam os efeitos hiperglicêmicos e hiperlipidêmicos das extrato das sementes, além de aumentar a secreção de insulina, aumento a conteúdo de glicogênio hepático e muscular e diminuição da gliconeogênese em coelhos diabéticos (Sharma *et al.*, 2011).

Administração via oral do EHSc mostrou um efeito hipoglicemiante e uma potencial ação protetora contra o estresse oxidativo e danos ao DNA em animais diabéticos induzidos com dieta rica em gorduras e estreptozotocina (HFD+STZ) (Baldissera *et al.*, 2016). O tratamento com extrato aquoso de semente preveniu significativamente a hiperglicemia, hiperinsulinemia, além do aumento da expressão de enzimas antioxidantes pancreáticas. Destaca-se também que as alterações patológicas na ilhota e nas células β causadas pela indução com HFD+ STZ. Estas alterações foram revertidas para níveis quase normais após tratamento com *Syzygium cumini* a 400 mg / kg. Além disso, o tecido hepático demonstrou expressões aumentadas de proteína PPAR γ e PPAR α (Sharma *et al.*, 2012).

Outros estudos demonstram a relevância farmacológica e caracterização do perfil de compostos polifenólicos presentes nas folhas de *Syzygium cumini* como uma potencial fonte de compostos bioativos (Chagas *et al.*, 2015). Tem sido relatado na literatura que a presença de glicosídeos, flavonóides, taninos, alcaloides, triterpenos e saponinas são responsáveis pela ação antidiabética, assim como sua ação antioxidante, o que explica a eliminação de radicais livres e um efeito protetor sobre as enzimas antioxidantes (Ayyanar e Subash-Babu, 2012).

Devido ao potencial terapêutico do *Syzygium cumini*, nosso grupo de pesquisa vem estudando o efeito anti-obesogênico, anti-hiperlipidêmico e anti-hiperglicêmico do extrato hidroalcoólico das folhas dessa espécie se certificado dos mecanismos envolvidos na evolução da obesidade induzida hipotalâmica pelo MSG (Sanches *et al.*, 2016). O tratamento por 30 dias com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* reduziu o peso, o tecido adiposo branco e triglicerídeos de animais obesos induzidos com glutamato monossódico (MSG). O EHSc melhora a hiperinsulinemia e resistência insulínica destes animais. Com o aumento das concentrações do extrato houve uma melhoria da resposta de secreção, provavelmente tendo o EHSc atuando como modulador (Sanches *et al.*, 2016).

2.6. Justificativa

O DM2 é um problema de saúde pública insidioso. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (FDI) (2015) sua incidência mundial foi de 415 milhões de casos em 2015 e estima-se cerca de 642 milhões até 2040. No Brasil, cerca de 1,9 milhão de indivíduos entre 20 e 79 anos de idade tem diabetes, classificando-o como o quarto país em número de casos de diabetes no mundo (Coutinho e Júnior, 2015). Pacientes diabéticos tem risco aumentado para o desenvolvimento de complicações metabólicas agudas e complicações crônicas como doenças coronarianas, retinopatia, nefropatia, neuropatia e ulcerações nos membros inferiores (Tiwari *et al.*, 2013).

Em busca de novas terapêuticas capazes de prevenir ou atenuar as consequências do DM2 busca-se tratamentos complementares, como por exemplo os fitoterápicos. Compostos polifenólicos tem sido utilizado na medicina e estudos comprovam seu potencial antioxidante na prevenção de várias doenças. Dentre essas espécies, destacamos as potencialidades terapêuticas do *Syzygium cumini*, estas estão associadas aos distúrbios metabólicos e suas comorbidades, conforme revisão recente publicada por nosso grupo (Chagas *et al.*, 2015). Em outro trabalho, demonstramos que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc)

melhora o quadro de dislipidemia, reduzindo o peso corporal e revertendo a hiperinsulinemia em ratos obesos (Sanches *et al.*, 2016).

Tendo em vista que, a espécie *Syzygium cumini* possui várias propriedades farmacológicas descritas, as quais reforçam seu potencial uso para o tratamento de distúrbios metabólicos relacionados ao DM2 e suas comorbidades. Outro aspecto importante é a carência de estudos demonstrando a ação *in vivo* do extrato sobre as propriedades antioxidantes e possível atividade regulatória do quadro de estresse oxidativo. Com isso, neste trabalho hipotetizamos que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* melhora os parâmetros oxidativos e a secreção de insulina em ratos com diabetes induzido por estresse oxidativo decorrente da administração de GCs.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos do extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini* (L.) Skeels sobre o perfil metabólico e estado redox em ratos diabéticos induzidos por dexametasona.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do EHSc sobre os parâmetros morfométricos, bioquímicos e hormonais nos animais;
- Avaliar os efeitos do EHSc sobre a secreção estática de insulina a partir de ilhotas isoladas dos animais;
- Avaliar os efeitos do EHSc sobre o perfil oxidativo e atividade do sistema antioxidante sérico dos animais.

4. Materiais e métodos

4.1. Material Botânico e preparo do extrato hidroalcoólico

Folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini* foram coletadas no campus de São Luís da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e encaminhadas ao Herbário Ático Seabra para serem identificadas e catalogadas.

O preparo do extrato hidroalcoólico foi realizado a partir de modificações da metodologia (Sharma *et al.*, 2008). As folhas coletadas foram colocadas em estufa com circulação de ar ($38 \pm 2^\circ\text{C}$) e em seguida, pulverizadas e maceradas em Etanol 70% (300 g; hidromódulo 1:6 p/v) sob agitação constante por 24 horas a 25°C com renovações diárias do solvente por um período de 72 horas. As soluções extrativas foram então reunidas, centrifugadas (3500 rpm; 10 min) e os sobrenadantes concentrados em evaporador rotativo (38°C), resultando no extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* (EHSc).

4.2. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar da espécie *Rattus Norvegicus* (machos, 90 dias), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno forradas com xilana, em ambiente com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso a água e ração.

Foram divididos três grupos experimentais com oito animais cada, sendo:

- Grupo controle (CTR): tratado por via oral com solução salina 0,9%;
- Grupo com diabetes induzido com Dexametasona (DEX) (1mg/ Kg/ dia) e tratado por via oral com solução salina 0,9%;
- Grupo Dexametasona + EHSc (DEX+EHSc), que recebeu tratamento de 10 dias com 500 mg/kg de EHSc. Os animais foram induzidos com dexametasona(1mg/ Kg/ dia) por cinco dias após o tratamento prévio de cinco dias com EHSc e durante a indução, totalizando 10 dias de tratamento, de acordo com o protocolo de Rafacho *et al.* (2010), mostrado na Figura 2.

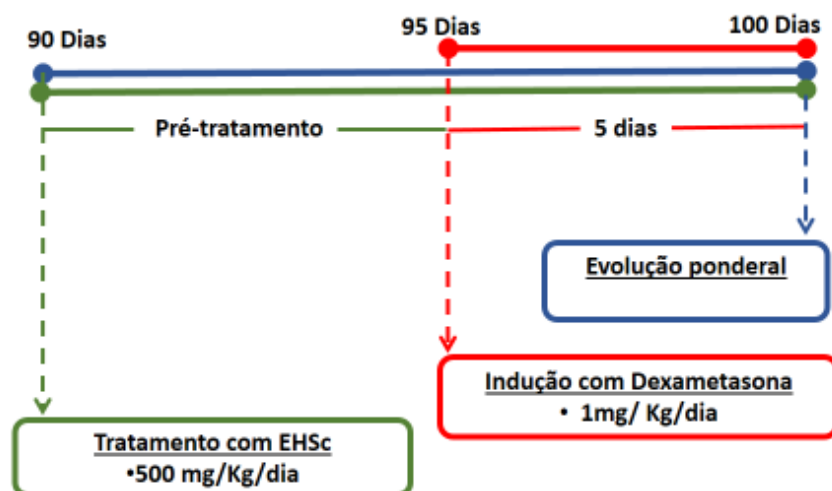


Figura 2. Fluxograma do protocolo de indução com dexametasona e tratamento do EHSc.

Todos os protocolos experimentais se encontram contemplados no processo encaminhado ao Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/ UFMA sob processo nº 23115.007440/2016-71(em anexo).

4.2.1. Peso corporal

O peso corpóreo dos animais estudados foi avaliado diariamente por um período de 10 dias.

4.3. Avaliações plasmáticas: glicemia, insulinemia e lipidograma.

Ao final do tratamento, os animais foram submetidos a uma restrição alimentar de 12 h para coleta de sangue pela artéria abdominal. As amostras de sangue foram recolhidas em tubos de EDTA e não-EDTA e centrifugados a 3500 rpm por 5 min para obtenção do soro para permitir a separação de plasma e de soro a partir de todos os grupos. O soro foi utilizado para a medição de espectrofotométricos de glicose, triglicerídeos, colesterol total, utilizando kits comerciais de acordo com as instruções do fabricante (Labstest®, Brasil).

A insulina foi quantificada por radioimunoensaio onde em 0,1 ml de soro de cada animal se adicionará 0,2 ml de solução contendo anticorpo anti-insulina (1:300.000) e insulina marcada com ^{125}I . (1800 a 2000 cpm) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9% e albumina 0,5%. A curva padrão de insulina foi

preparada adicionando 0,1 ml de solução de insulina com concentrações crescentes (0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/mL) em 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos, eles foram agitados em vórtex e estocados a 4°C, durante 48 horas. Após esse período, acrescentou-se em cada tubo 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão (Norit A), 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso (20 minutos) e a seguir centrifugados (20 minutos; 2800 rpm; 4 °C). O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. As concentrações de insulina (ng/ml) das amostras foram determinadas a partir da curva padrão (Camporez, 2008).

4.4. Parâmetros hepáticos

Para avaliação da gordura hepática foram utilizado a metodologia de (Freedman *et al.*, 2005) com algumas modificações. Assim, 500 mg de tecido foram homogeneizados com 5 ml da mistura de clorofórmio/metanol (2:1) para serem deixados *overnight* (16 horas; 4-8 °C) para a extração das gorduras. Em seguida, o tecido foi separado por filtração e ao filtrado adicionado NaCl 0,9% (1 salina: 5 filtrado). Essa mistura foi agitada, deixada em repouso por 2 horas e centrifugada para separação das fases metanólica e clorofórmica. Um volume específico desta fase orgânica foi coletado e seca, ficando apenas a massa de gordura sólida, que foi pesada. Por fim, essa gordura foi ressuspensa em Triton x-100/metanol (2:1) para determinação das concentrações de triglicerídeos e colesterol através de ensaios enzimáticos colorimétricos.

4.5. Teste de tolerância intraperitoneal à glicose

Para o teste de tolerância intraperitoneal à glicose (GTTip), os animais foram submetidos a jejum de 8 horas previamente a administração de 2 g/kg de glicose (IP). As amostras de sangue capilar foram coletadas por corte na cauda imediatamente antes (tempo 0) e 15, 30, 60 e 120 min após a injeção para a medição de glicose no sangue por meio de glicosímetro (Accu-check Active, Roche Diagnostic, Alemanha).

4.6. Avaliação de resistência à insulina

A RI foi inferida a partir do cálculo do Índice de TyG ($TyG = \ln [\text{triglicérides de jejum (mg/dL)} \times \text{glicemia de jejum (mg/dL)} / 2]$) (Simental-Mendia et al., 2008), modelo de avaliação da homeostase (HOMA) Índice de resistência à insulina ($HOMA-IR = 636 \text{ insulina de jejum (U/mL)} / \text{glicose de jejum (mM)} / 22,5$) e HOMA Índice da função das células- β ($HOMA-B = 20 \times \text{insulina de jejum (U/mL)} / \text{glicose de jejum (mM)} - 3,5$) (Matthews et al., 1985).

4.7. Avaliação da secreção estática de insulina em ilhotas isoladas

4.7.1. Isolamento das ilhotas

Os animais foram eutanasiados e o ducto pancreático infundido com collagenase tipo V (0.8 mg/mL, em tampão de Hanks + glicose 5.6 mM + 0.5 mg/mL BSA) Sigma Aldrich, EUA. Após o isolamento, este material foi colocado em banho-maria, 37°C, durante 25 minutos. Em seguida, foram feitas 4 lavagens com solução de Hanks contendo albumina bovina (BSA) fração V 0,3% e glicose 5.6mM. As ilhotas foram coletadas com auxílio de lupa.

4.7.2. Secreção estática de insulina

As ilhotas coletadas foram pré-incubadas em duas placas de cultura com 24 reservatórios, contendo 5 ilhotas, 1 mL de solução de Krebs-Hepes (KRBH), pH 7.4 suplementada com 0,3% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose por 45 min a 37 °C em ambiente controlado (gaseificado com 95% O₂ + 5% CO₂). Em seguida, o meio de pré-incubação foi descartado e na primeira placa as ilhotas foram incubadas em uma concentração de 5,6 mM e na segunda placa em uma condição de 16,7 mM de glicose.

4.8. Preparo dos tecidos para a avaliação de atividade enzimática antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante se deu a partir da determinação da atividade enzimática a nível sérico preparadas de acordo com as determinações dos kits da Cayman Chemical ®. As amostras de sangue foram coletadas sem o uso de anticoagulantes e após 30 minutos a 25°C. Em seguida, foram centrifugadas a 2.000

xg por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação a porção amarela do soro foi aliquoteada sem a presença de tampão de lise e armazenada no freezer -80°C.

4.8.1. Enzima superóxido dismutase (SOD)

Adicionou-se 200 µL de radical de detecção e 10 µL de padrão em tubos enumerados de A-G nos poços correspondentes para realização da curva padrão. Para as amostras de soro foi realizada uma diluição de 1:5 em solução padrão. Para o ensaio foi utilizado uma placa de 96 poços, onde foi adicionado 200 µL de radical de detecção diluído e 10 µL das amostras de soro. A reação foi iniciada após a adição de 20 µL de Xantina oxidase diluída em todos os poços e realizada o mais rápido possível para evitar alterações na reação. Incubar a placa com agitação por 20 minutos em temperatura ambiente e protegida da luz. A leitura foi feita em 460nm em leitor de placa. As respectivas diluições ocorreram de acordo com as especificações do kit (Cayman Chemical®).

4.8.2. Enzima catalase (CAT)

Para a curva padrão foram adicionados 100 µL de tampão de ensaio, 30 µL de metanol e 20 µL de padrão de formaldeído. Os controles positivo foram adicionados em dois poços 100 µL de tampão de amostra diluído, 30 µL de metanol e 20 µL de catalase diluída e adicionadas nos mesmos volumes as amostras. Para iniciar a reação utilizou-se 20 µL de peróxido de hidrogênio em todos os poços e realizada o mais rápido possível para evitar alterações na reação. A placa foi coberta e colocada em agitação por 20 minutos em temperatura ambiente e adicionados 30 µL de hidróxido de potássio e 30 µL de *Catalase Purpald* em todos os poços. Em seguida, a placa foi agitada e adicionado 10 µL catalase periodato de potássio. Repetiu-se o processo de agitação em temperatura ambiente por 5 minutos e foi feita a leitura da absorbância em 540 nm pelo leitor de placa. As respectivas diluições ocorreram de acordo com as especificações do kit (Cayman Chemical®).

4.8.3. Enzima glutathione peroxidase (GPx)

Para a avaliação da enzima GPx foram utilizados três poços para o controle não-enzimático, onde adicionou-se 120 µL de tampão de amostra e 50 µL de mistura

de co-substrato. Para o controle positivo foram adicionados 100 µL de tampão de amostra, 50 µL mistura de co-substrato e 20 µL de GPx diluída. Para as amostras de plasma foram adicionadas 100 µL de tampão de amostra, 50 µL de mistura de co-substrato e 20 µL de amostra. Para iniciar a reação foi adicionado 20 µL de hidroperóxido de cumeno em todos os poços em seguida foi feita leitura em uma absorbância de 340nm. As respectivas diluições ocorreram de acordo com as especificações do kit (Cayman Chemical®).

4.9. Parâmetros oxidativos

4.9.1. Hidroperóxidos totais

O teor de hidroperóxidos totais (LOOH) foi obtido a partir da oxidação de íons férricos na presença de alaranjado de xilenol como proposto por Jiang et al (1992), com adaptações. Para isto, foram adicionados em tubos de ensaio 150 µl do SC da *SNPca* 1350 µl de uma solução de metanol 90% (codificada como solução FOX) contendo 100 µM de alaranjado de xilenol + 25 mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4) + 4 mM de hidroxitoulénobutilado (BHT) + 250 µM de sulfato ferroso amoniacal $[(Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O)]$. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos para que ocorra a reação, centrifugada (3.000 rpm; 10 min) e lida em espectrofotômetro em comprimento de 560 nm. O branco consistiu na solução FOX submetida aos mesmos procedimentos e para a curva padrão de LOOH foi preparada uma solução estoque de 5 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a partir da mesma foram tomadas alíquotas de modo a obterem-se concentrações finais de 0,025 – 0,4 mM de H_2O_2 . Os resultados foram expressos em mg de LOOH/mg de proteínas totais.

4.10. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias (e.p.m). A análise dos dados dos experimentos foi realizada por meio de testes estatísticos paramétricos (ANOVA-Newman-Keuls) ou não paramétricos (ANOVA- Kruskal-Wallis ou Dunn's) e analisados utilizando programa GraphPad Prism® (versão 6.0). O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5. Resultados

5.1. Efeitos do EHSc sobre o ganho de peso e parâmetros morfométricos

A Figura 3 mostra a evolução do peso corporal dos animais em todos os grupos. O tratamento com o EHSc (500 mg/Kg/dia) promoveu significativa perda de peso a partir do 3º dia de tratamento. No sexto dia de acompanhamento, quando foi iniciada a indução do DM2 com dexametasona, os animais dos grupos CTR e DEX apresentavam ganho de peso semelhante (CTR: $7,54 \pm 1,36$ g; DEX: $4,55 \pm 2,93$ g), enquanto o grupo DEX+EHSc acumulava uma perda de $17,66 \pm 3,66$ g, $p < 0,05$. Após a administração da dexametasona, os animais DEX apresentaram perda média de $38,71 \pm 2,30$ g ao final de 5 dias. O tratamento com EHSc não preveniu a perda de peso induzida por dexametasona, levando os animais DEX+EHSc a uma perda de peso acumulada de $54,30 \pm 3,46$ g.

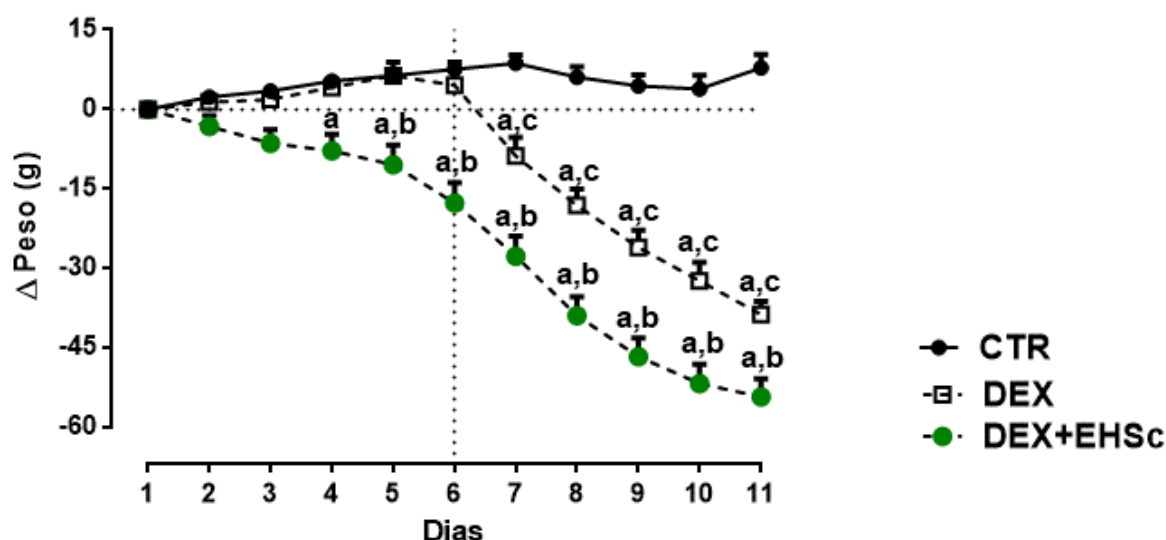


Figura 3. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre o delta de peso corporal de ratos *Wistar* machos controle (CTR), dexametasona (DEX) e animais tratados com EHSc (DEX+EHSc) ($n=11$). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. Para diferença entre os grupos foi utilizado o teste *Two way* ANOVA, $p < 0,05$. (a) diferença significativa em relação ao grupo CTR; (b) diferença significativa em relação ao grupo DEX; (c) diferença significativa em relação ao grupo DEX+EHSc.

Com o objetivo de verificar os efeitos do tratamento com o EHSc sobre os parâmetros morfométricos, mensurou-se os pesos relativos de fígado, coxins

adiposos (retroperitoneal e periepididimal) e músculo esquelético (gastrocnêmio e sóleo). O coxim retroperitoneal diminuiu em 41,3% nos animais DEX ($0,387 \pm 0,02$ g/100g) e 34,2% nos animais DEX+EHSc ($0,433 \pm 0,03$ g/100g) em relação ao CTR ($0,659 \pm 0,01$ g/100g), $p < 0,05$. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os pesos relativos do fígado, gordura periepididimal e músculo esquelético (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros morfométricos de ratos tratados com o extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini*, dexametasona e seus controles.

Parâmetros Morfométricos (g/100g de peso corporal)	CTR	DEX	DEX+EHSc
Fígado	$3,40 \pm 0,1$	$3,44 \pm 0,1$	$3,46 \pm 0,06$
Gordura periepididimal	$0,863 \pm 0,02$	$0,780 \pm 0,05$	$0,915 \pm 0,08$
Gordura retroperitoneal	$0,659 \pm 0,01$	$0,387 \pm 0,02^*$	$0,433 \pm 0,03^*$
Músculo (gastrocnêmio + sóleo)	$0,726 \pm 0,02$	$0,619 \pm 0,04$	$0,610 \pm 0,03$

Os valores foram expressos com média $\pm$ e.p.m (n=8). * Indica diferença estatística em relação ao grupo CTR e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Kruskal- Wallis (GraphPad Prism®), $*p < 0,05$.

5.2. Efeito do EHSc sobre os parâmetros bioquímicos séricos

A indução de DM2 com dexametasona elevou a glicemia em jejum dos animais DEX em 34,1 % ($125,6 \pm 3,20$ mg/dL), em relação ao grupo CTR ($93,6 \pm 1,97$ mg/dL). O tratamento com EHSc atenuou o efeito hiperglicemiante da dexametasona, uma vez que, a glicemia em jejum do grupo DEX+EHSc foi reduzida a $115,6 \pm 4,11$ mg/dL; valor médio 21,6 % maior que o CTR, porém 8,6 % menor que o grupo DEX (Figura 4A). Os grupos não apresentaram diferenças estatísticas entre si quando avaliados os níveis de colesterol sérico total (Figura 4B). Por outro lado, houve aumento de 142,5% do triglicerídeo sérico no grupo DEX ($196,5 \pm 14,7$ mg/dL) em relação ao CTR ($81,02 \pm 10,5$ mg/dL), $p < 0,05$. O efeito hipertrigliceridemiante da dexametasona foi sobremaneira atenuado nos animais do grupo DEX+EHSc5 ($123,4 \pm 7,32$ mg/dL), valor 34,4% superior ao verificado nos CTR, $p < 0,05$ (Figura 4C). Finalmente, os níveis de insulina sérica dos animais do grupo DEX ($5,79 \pm 1,18$ ng/mL) foi cerca de 10 vezes

superior àqueles do grupo CTR ($0,56 \pm 0,09$ ng/mL), $p < 0,05$. O tratamento com EHSc reduziu a insulinemia do grupo DEX+EHSc para $2,31 \pm 1,07$ ng/mL, valor 4 vezes maior, mas não estatisticamente diferente do CTR (Figura 4D).

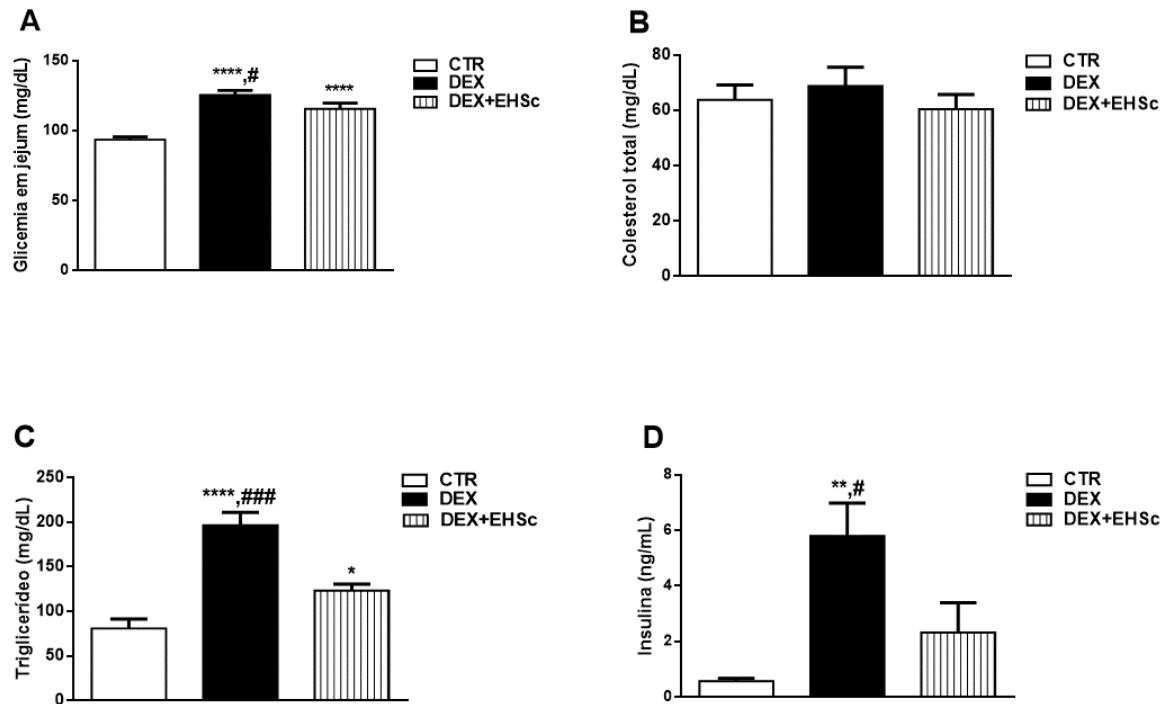


Figura 4. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre os parâmetros bioquímicos. (A) Glicemia em jejum (mg/dL) (n=15), (B) Colesterol (mg/dL) (n=8), (C) Triglicerídeos de jejum (mg/dl) (n=8) e (D) Insulinemia (ng/mL) (n=5). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. * diferença significativa em relação ao grupo CTR, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # diferença significativa em relação ao grupo DEX+EHSc, # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$.

5.3. Efeito do EHSc sobre o conteúdo de lipídeos hepáticos

A administração de dexametasona, bem como o tratamento com EHSc não alteraram o conteúdo total de gordura hepática, nem da fração de colesterol hepático (Figura 5A e 5C, respectivamente). Entretanto, a dexametasona promoveu o aumento de 106,1% no conteúdo de triglicerídeos hepáticos ($18,49 \pm 0,8$ mg/g) em relação ao CTR ($8,96 \pm 1,6$ mg/g), $p < 0,05$. O tratamento com EHSc preveniu totalmente o acúmulo de triglicerídeo no grupo DEX+EHSc ($7,19 \pm 0,5$ mg/g).

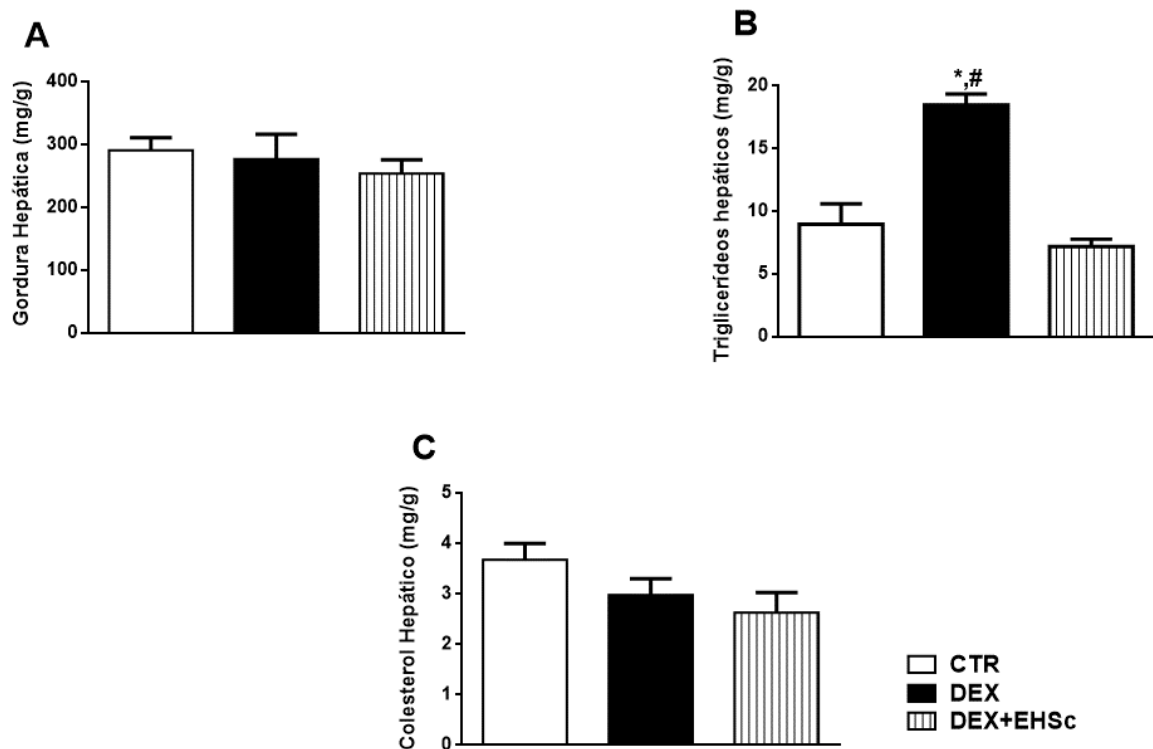


Figura 5. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre conteúdo lipídico hepático de ratos *Wistar* machos controle (CTR), dexametasona (DEX) e animais tratados com EHSc (DEX+EHSc) (n=11). (A) Gordura hepática (mg/g), (B). Triglicerídeos hepáticos (mg/g) e (C) Colesterol hepático. Valores representam média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Kruskal-Wallis (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. * diferença significativa em relação ao grupo CTR; # diferença significativa em relação ao grupo DEX+EHSc.

5.4. Efeito do EHSc sobre a tolerância à glicose, resistência à insulina e atividade secretória do pâncreas endócrino

A avaliação da tolerância à glicose administrada por via intraperitoneal demonstrou diminuição da tolerância no grupo DEX, caracterizada por elevação da glicemia em aproximadamente 90% (CTR: $250,3 \pm 33,5$ vs. DEX: $480,5 \pm 57,3$ mg/dL; $p < 0,05$) aos 15 minutos após a injeção de glicose (Figura 6). No entanto, não houve diferença entre os grupos nos demais tempos, tampouco quando analisadas as áreas sob as curvas da variação da glicemia durante o teste (Figura 6, inserto).

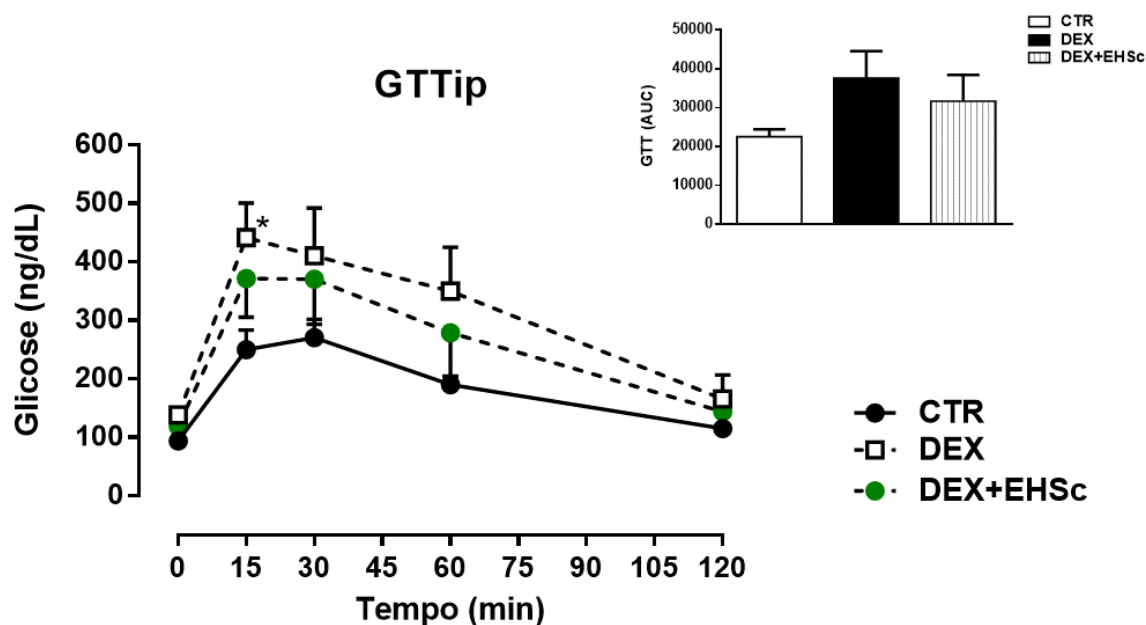


Figura 6. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre o teste de tolerância à glicose via intraperitoneal e área sobre a curva (AUC), inserto (n=5). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. Para o GTT foi utilizado o teste *Two way* ANOVA. *: diferença significativa em relação ao grupo CTR.

Por outro lado, a avaliação da sensibilidade periférica à ação da insulina, realizada através do cálculo dos índices TyG e HOMA-IR, demonstrou que a administração de dexametasona no grupo DEX ($9,409 \pm 0,12$ e $0,0310 \pm 0,006$, respectivamente) reduz a sensibilidade à insulina em relação ao grupo CTR ($8,102 \pm 0,21$ e $0,0046 \pm 0,001$, respectivamente), $p < 0,05$. O tratamento com o EHSc atenuou este efeito ao melhorar a sensibilidade à insulina verificada em ambos os testes ($8,83 \pm 0,10$ e $0,0161 \pm 0,007$, respectivamente) (Figuras 7A e 7B). O índice HOMA-%B foi calculado para a avaliação da atividade secretória da célula β nos grupos experimentais. Os animais DEX ($728,7 \pm 171,1$) apresentaram índice 4 vezes superior aos animais CTR ($212,2 \pm 81,1$), o qual foi reduzido para aumento de 2,5 vezes nos animais DEX+EHSc ($486,2 \pm 257,9$), não diferindo estatisticamente dos CTR (Figura 7C).

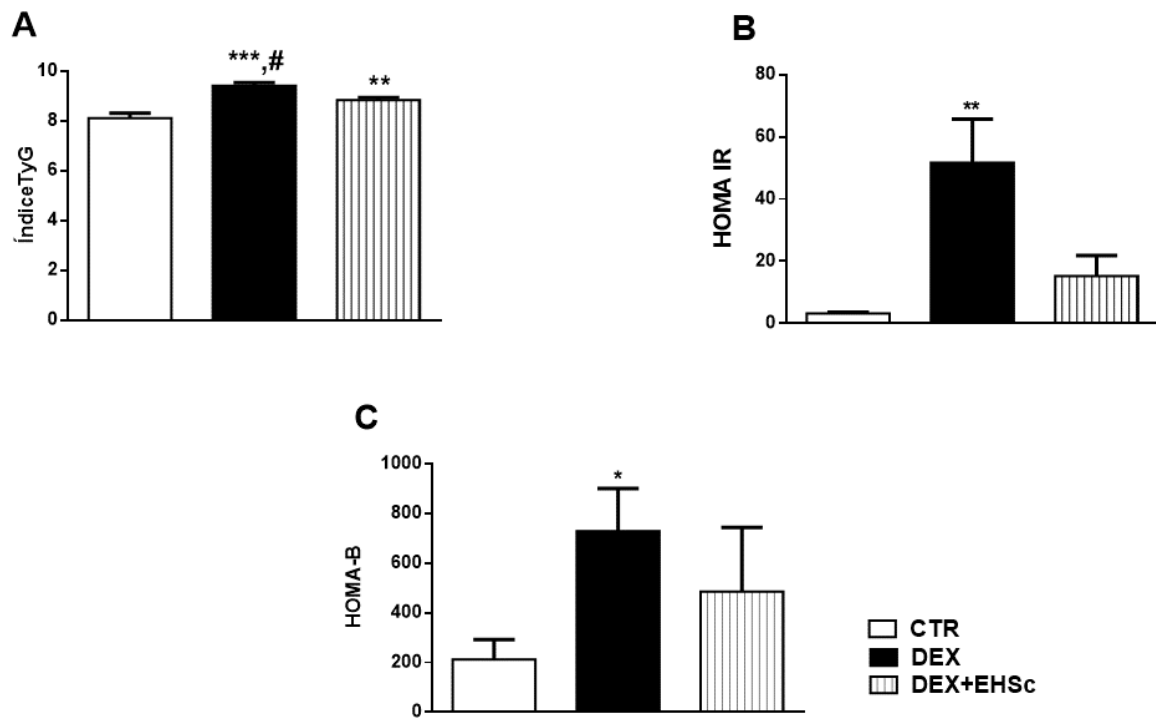


Figura 7. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre a resistência à insulina e atividade secretória do pâncreas endócrino. (A) Insulinemia (ng/mL), (B) HOMA-IR e (C) HOMA % B (n=5). Os valores são expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA Kruskal-Wallis (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. *: diferença significativa em relação ao grupo CTR, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; # diferença significativa em relação ao grupo DEX+EHSc.

Para verificação da atividade secretória efetiva da célula β , avaliou-se a secreção de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos CTR, DEX e DEX+EHSc. Os dados apresentados na Figura 8 mostram que sob condições basais (glicose 5,6 mM) as ilhotas dos animais DEX ($1,62 \pm 0,15$ ng/mL/h) e DEX+EHSc ($1,45 \pm 0,25$ ng/mL/h) apresentaram secreção basal de insulina aumentada em relação às ilhotas de animais do grupo CTR ($0,20 \pm 0,02$ ng/mL/h), $p < 0,05$. Quando a concentração de glicose foi elevada a 16,7 mM, as ilhotas dos animais CTR apresentaram maior atividade, com aumento da secreção para $3,99 \pm 0,38$ ng/mL/h, enquanto os animais DEX apresentaram secreção duas vezes maior ($8,90 \pm 1,26$ μ g/mL/h), $p < 0,05$. Nas ilhotas oriundas dos animais tratados com EHSc, a resposta de hipersecreção induzida pela dexametasona sob hiperglicemia foi abolida ($3,029 \pm 0,24$ μ g/mL/h), não diferindo do CTR.

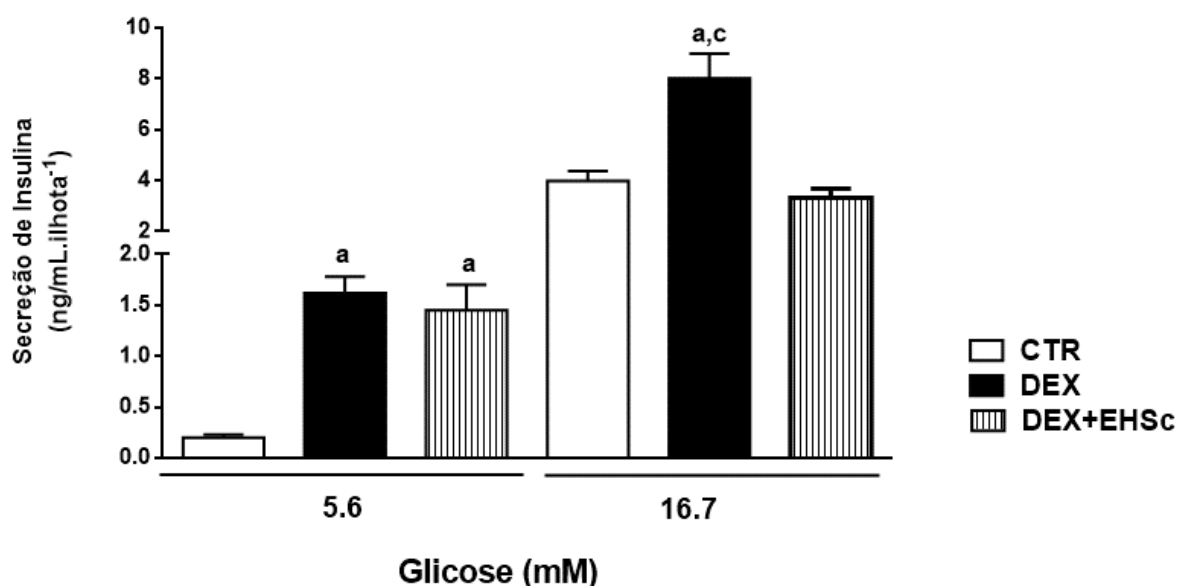


Figura 8. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Syzygium cumini* sobre a secreção estática de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas de animais controle (CTR), dexametasona (DEX) e animais dexametasona tratados do *Syzygium cumini* (DEX+EHS). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA seguido de pós-teste Newman-Keuls (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. (a) diferença significativa em relação ao grupo CTR; (c) diferença significativa em relação ao grupo DEX+EHS.

5.5. Efeito do EHS sobre sistema de defesa antioxidante e parâmetros oxidativos.

Para avaliação do estado redox dos animais nos grupos CTR, DEX e DEX+EHS, avaliou-se a atividade sérica das principais enzimas do sistema de defesa antioxidante: SOD, CAT e GPx. Conforme pode ser observado na Figura 9A, a atividade da SOD nos animais DEX ($3,23 \pm 0,75$ U/ml) foi aproximadamente 3 vezes superior aos CTR ($1,08 \pm 0,09$ U/ml). Aumento semelhante foi verificado no grupo DEX+EHS ($3,20 \pm 0,37$ U/ml). A atividade da CAT também estava aumentada nos animais DEX ($54,17 \pm 11,2$ nmol/min/ml), quando comparados aos CTR ($20,14 \pm 1,01$ nmol/min/ml), caracterizando o modelo de DM2 induzida por dexametasona como um modelo de estresse oxidativo. Nos animais tratados com EHS, a atividade da CAT foi marginalmente reduzida para $36,03 \pm 7,01$ nmol/min/ml (Figura 9B). A atividade da GPx não variou entre os grupos (Figura 9C). Para a determinação dos danos oxidativos decorrentes do estresse oxidativo caracterizado acima, quantificou-se a formação de hidroperóxidos que é um produto da lipoperoxidação. Observou-se aumento de 27,2% desses produtos no soro dos animais DEX ($11,28 \pm 0,7$ μ M) em

relação ao CTR ($8,22 \pm 0,4 \mu\text{M}$), efeito abolido nos animais DEX+EHSc ($7,86 \pm 1,3 \mu\text{M}$) (Figura 10).

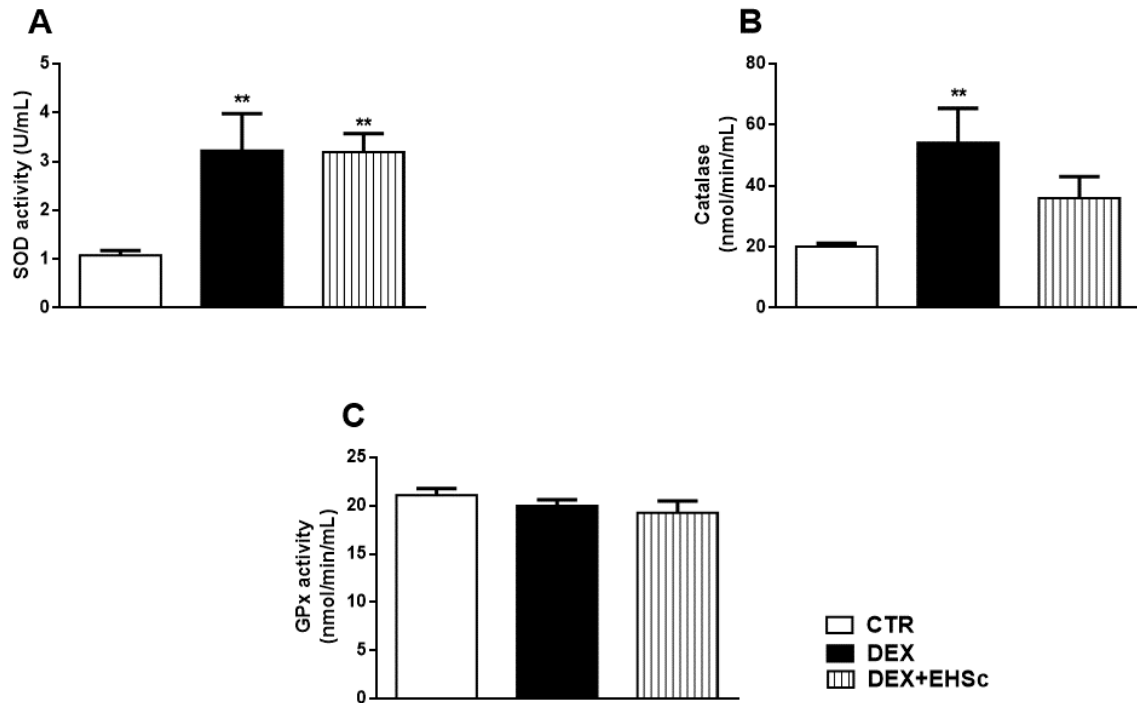


Figura 9. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre atividade das enzimas antioxidantes (A) Enzima Superóxido Dismutase (SOD), (B) Enzima Catalase (CAT) e (C) Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx) (n=8). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA e pós teste de Dunn's (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. * diferença significativa em relação ao grupo CTR, ** $p < 0,01$.

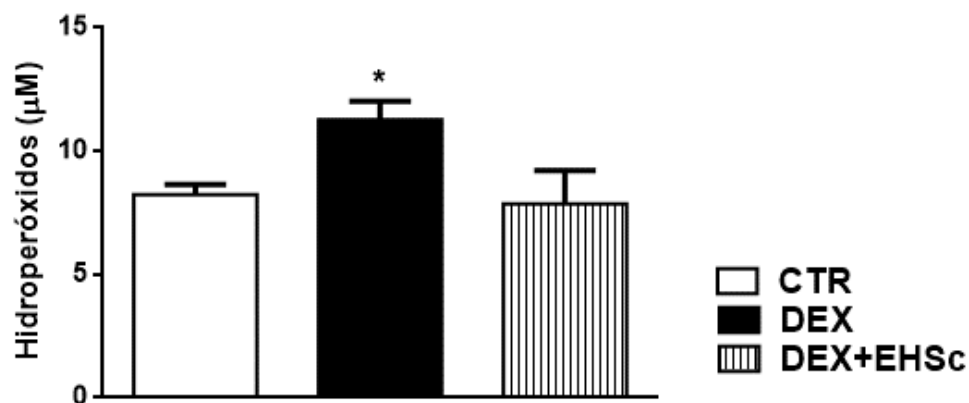


Figura 10. Efeitos do extrato hidroalcoólico das folhas do *Syzygium cumini* sobre a formação de hidroperóxidos por reação de FOX (n=8). Os valores foram expressos como média $\pm$ e.p.m e analisados por ANOVA e pós teste Kruskal-Wallis (GraphPad Prism®), $p < 0,05$. * diferença significativa em relação ao grupo CTR.

6. Discussão

Os resultados deste trabalho reforçam o potencial antidiabético do EHSc, uma vez que, o tratamento de ratos com DM2 induzida por dexametasona com o extrato promoveu redução dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e insulina em jejum; reverteu o acúmulo hepático de triglicerídeos; melhorou a sensibilidade periférica à ação da insulina e atenuou a hipersecreção de insulina induzida por hiperglicemia em ilhotas de Langerhans isoladas dos animais tratados. Estes efeitos, parecem estar relacionados à melhora do ambiente redox sérico destes animais, os quais apresentaram menor peroxidação e menor atividade da enzima antioxidante catalase, permitindo-se inferir melhoras nos efeitos oxidativos causados pela dexametasona.

O tratamento com o EHSc promoveu a redução de peso corporal dos ratos DEX+EHSc, anteriormente à administração de dexametasona. Trabalhos realizados com extratos preparados a partir de diferentes partes da planta apresentam o mesmo efeito na redução de peso corporal em ratos (Oliveira *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2016). Após a indução do DM2, houve também redução significativa no peso corporal dos animais DEX e DEX+EHSc, porém esta perda de peso parece estar relacionada com o aumento da atividade catabólica causada pelos GCs (Capurso e Capurso, 2012). Outros estudos afirmam que a hiperinsulinemia observada nos ratos tratados com dexametasona também está relacionado com a perda de peso corporal, atuando no hipotálamo e favorecendo a supressão da ingestão de alimentos (Rafacho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2015). Uma limitação deste trabalho é não ter sido verificada a ingestão de ração dos animais.

A administração de dexametasona nos grupos experimentais promoveu redução significativa apenas do peso relativo da gordura retroperitoneal, o que está relacionado ao aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo branco não visceral estimulada pelos GCs (Rafacho *et al.*, 2014). De fato, Rafacho *et al.* (2008) avaliaram os coxins adiposos de animais tratados com diferentes doses de dexametasona (0,1 – 1 mg/Kg/dia) e também observaram redução apenas da gordura retroperitoneal. Por outro lado, há estudos nos quais a administração de dexametasona (1 mg/Kg/dia) em ratos resultou em aumento da gordura periepididimal, com efeitos variáveis em outros coxins adiposos (Nunes *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2015).

Nossos dados mostram que o aumento da glicemia e trigliceridemia em jejum causada pela dexametasona administrada por 5 dias foi atenuada nos animais DEX+EHSc. Os efeitos negativos dos glicocorticóides sobre a homeostase glicêmica dependem da dose e/ou do tempo de exposição, os quais promovem aumento das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e insulina, além do conteúdo de lipídeos hepáticos, podendo ou não ser acompanhada de hiperglicemia em jejum (Rafacho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2015; Protzek *et al.*, 2016). O EHSc reduziu o conteúdo hepático de triglicerídeos, reduzindo-o a níveis semelhantes ao CTR. De maneira semelhante, o EHSc também reduziu os níveis de triglicérides séricos e hepáticos em animais com síndrome metabólica induzida por L-glutamato monossódico (Sanches *et al.*, 2016).

Como consequência, o EHSc reduziu o índice TyG, cálculo matemático que apresenta significativa correlação com os primeiros indicadores de RI, como insulinemia em jejum, perfil lipídico sérico e massa adiposa visceral (Rodríguez-Morán *et al.*, 2017). Além disso, o tratamento com o EHSc restaurou a sensibilidade periférica à insulina verificada pelo índice HOMA-IR, bem como melhorou a atividade secretória na célula β . Vários estudos experimentais demonstram que os GCs reduzem a sensibilidade à insulina em ratos, bem como estimulam a secreção de insulina (Rafacho *et al.*, 2009; Protzek *et al.*, 2016). De acordo com os dados da atividade secretória da célula β verificada nos ensaios *ex-vivo*, os animais DEX apresentaram hipersecreção de insulina tanto em condições basais de glicose (5,6 mM), quanto em condição de hiperglicemia (glicose 16,7 mM). Porém, nos animais que receberam o tratamento com o EHSc, a resposta secretória frente à hiperglicemia foi reduzida a níveis normais.

Compostos presentes nas diversas partes do *Syzygium cumini* destacam-se por ação direta na biossíntese, secreção ou ação da insulina, bem como melhora de parâmetros metabólicos (Ayyanar *et al.*, 2013). Administração oral do extrato com frações de acetato de etila de *Syzygium cumini* recuperou a atividade da hexoquinase hepática e da glicose 6- fosfatase, consequentemente melhorando os níveis de glicose sérico, perfil lipídico, conteúdo de glicogênio hepático e muscular em ratos diabéticos. Estudos demonstram que o *Syzygium cumini*, bem como seus compostos isolados,

ativam de canais de cálcio do tipo L, responsáveis pela secreção de insulina (Fusi *et al.*, 2003; Bardy *et al.*, 2013). Entretanto, em modelos animais onde o DM2 é causado por estresse oxidativo, como é o caso da indução por dexametasona (Costantini *et al.*, 2011), é possível sugerir que a melhora do perfil metabólico decorra da ação antioxidante dos compostos presentes no extrato antioxidante (Zheng *et al.*, 2011; Mohamed *et al.*, 2013). Nosso grupo de pesquisa caracterizou os principais compostos fitoquímicos presentes no EHSc, destacando-se os flavonoides derivados da mirecetina (Sanches *et al.*, 2016). A mirecetina e seus derivados são potentes antioxidantes (Semwal *et al.*, 2016) melhora a sinalização de insulina no músculo esquelético (Tzeng *et al.*, 2011), adipócitos (Wang *et al.*, 2015), bem como, protege as células β da ação de citocinas inflamatórias (Ding *et al.*, 2012).

A regulação positiva das enzimas antioxidantes pode ajudar a minimizar o estresse oxidativo e o desenvolvimento das complicações crônicas do DM2, enquanto a regulação negativa pode decorrer da inibição da expressão ou redução da concentração da ERO que serve de substrato para cada enzima (Newsholme *et al.*, 2016). Para verificação dos efeitos do EHSc sobre o perfil redox sistêmico dos animais, avaliamos a atividade sérica das enzimas antioxidantes. Observou-se aumento expressivo da atividade da SOD nos grupos DEX e DEX+EHSc em relação ao grupo CTR, demonstrando ausência de efeito do EHSc sobre esta enzima. A atividade da SOD influencia as atividades das enzimas CAT e GPx, uma vez que, estas enzimas reduzem o H_2O_2 gerado pela SOD (Halliwell e Gutteridge, 2015). Os animais DEX apresentaram elevação da atividade da CAT, mas não da GPx, quando comparados aos CTR, demonstrando que a CAT é a principal responsável pela redução do excesso de H_2O_2 gerado nesse modelo animal. O tratamento com EHSc não alterou a atividade da GPx, porém reduziu parcialmente a atividade da CAT, sugerindo diminuição do estresse oxidativo sistêmico nos animais DEX+EHSc. Estes resultados diferem daqueles descritos por Ravi *et al.* (2004), os quais mostraram que animais diabéticos tratados com extrato da pele dos frutos de *Syzygium cumini* tiveram a atividade pancreática das enzimas SOD, CAT e GPx reduzidas a níveis normais.

Estudos *in vitro* demonstram que o aumento da formação de H_2O_2 decorrente da exposição à dexametasona causa efeitos deletérios em diversos processos

celulares e tecidos, incluindo as células β , e consequentemente a secreção de insulina (Roma *et al.*, 2011). Sendo assim, para avaliar a extensão dos danos oxidativos, foi avaliada a formação de hidroperóxidos séricos. O grupo DEX apresentou aumento significativo da concentração de hidroperóxidos, o qual foi abolido nos animais DEX+EHSc. Dada a já descrita atividade antioxidante do EHSc (Sanches *et al.*, 2016), é possível sugerir que o sequestro de ERO, especialmente H_2O_2 , pelos compostos polifenólicos presentes no EHSc seja responsável pela inibição da peroxidação, bem como pela diminuição parcial da atividade da CAT, com consequente atenuação da disfunção metabólica gerada pela administração de dexametasona, conforme sintetizado na Figura 11.

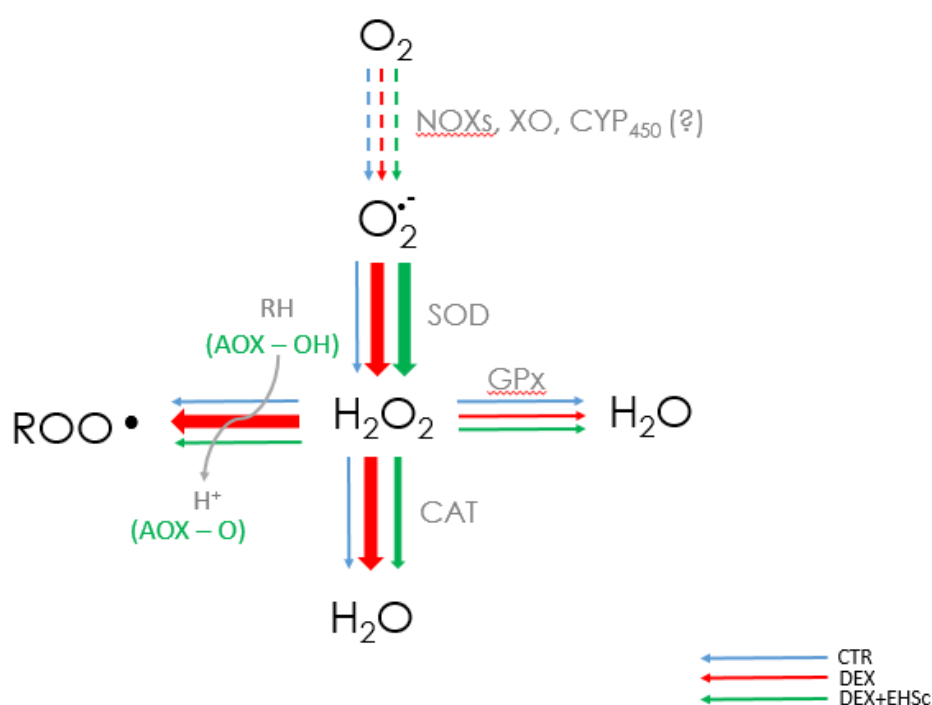


Figura 11. Ação antioxidante sérica do extrato hidroalcoólico de *Syzygium cumini*. A geração de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) a partir do oxigênio molecular é mediada pelo complexo da NADPH oxidase (NOXs), xantina oxidase (XO), Citocromo P 450 (CYP450), mitocôndrias e peroxissomos. A dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é realizada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é reduzido a água (H_2O) pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Em consequência do estresse oxidativo, há formação de produtos de lipoperoxidação ($ROO^{\bullet}$), nos quais os danos causados por estes produtos são amenizados pela ação dos compostos antioxidantes (AOX). CTR: animais do grupo controle; DEX: animais diabéticos induzidos dexametasona; DEX+EHSc: animais diabéticos tratados com EHSc.

7. Considerações Finais

Em conjunto, nossos dados mostram que o EHSc melhora parâmetros metabólicos, principalmente a glicemia em jejum, trigliceridemia e insulinemia. O conteúdo de triglicerídeos hepáticos foi diminuído a níveis normais após tratamento com o EHSc por 10 dias. Além destas respostas, observa-se uma tentativa de recuperação da sensibilidade à insulina, verificada pela atenuação dos índices TyG, HOMA-IR e HOMA%B. A hipersecreção de insulina causada pela indução do DM2 com a dexametasona é observada em condições basais (glicose 5,6 mM) e hiperglicemia (glicose 16,7 mM), sendo que o EHSc modulou a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas evitando a hipersecreção de insulina induzida por hiperglicemia. Outro dado importante, se refere a atividade antioxidante sistêmica do EHSc, com diminuição da formação de hidroperóxidos e redução da sobrecarga de H_2O_2 para redução pela enzima CAT, sugerindo a ação antioxidante dos compostos bioativos presentes no EHSc como um possível mecanismo para os efeitos citados acima. Dessa maneira, concluímos que o EHSc melhora o perfil metabólico dos animais com DM2, bem como a sua resposta antioxidante. Assim, o EHSc pode ser visto como potencial recurso terapêutico para o tratamento do DM2 e suas consequências.

8. Referências

ANGELONI, C. et al. Dietary polyphenols and their effects on cell biochemistry and pathophysiology. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012. ISSN 1942-0900.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P. Syzygium cumini (L.) Skeels: A review of its phytochemical constituents and traditional uses. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 3, p. 240-246, 2012. ISSN 2221-1691.

AYYANAR, M.; SUBASH-BABU, P.; IGNACIMUTHU, S. Syzygium cumini (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences. **Complementary therapies in medicine**, v. 21, n. 3, p. 232-243, 2013. ISSN 0965-2299.

BALDISSERA, G. et al. Effects of crude hydroalcoholic extract of Syzygium cumini (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in rats with diabetes induced by a high-fat diet and low doses of streptozotocin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 1012-1021, 2016. ISSN 0378-8741.

BARBOSA, A. M. et al. Fish oil supplementation attenuates changes in plasma lipids caused by dexamethasone treatment in rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 41, n. 4, p. 382-390, 2015. ISSN 1715-5312.

BARDY, G. et al. Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells. **British journal of pharmacology**, v. 169, n. 5, p. 1102-1113, 2013. ISSN 1476-5381.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012. ISSN 1939-4551.

CAI, Z.; YAN, L.-J. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health. **Journal of biochemical and pharmacological research**, v. 1, n. 1, p. 15, 2013.

CAMPOREZ, J. P. G. **Efeito in vitro do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre a via IRS/PI3-K/Akt e Secreção de Insulina em Ilhotas Pancreáticas de Ratos**. 2008. Universidade de São Paulo

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free radical biology and medicine**, v. 14, n. 3, p. 303-311, 1993. ISSN 0891-5849.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids. **Vascular pharmacology**, v. 57, n. 2, p. 91-97, 2012. ISSN 1537-1891.

CHAGAS, V. T. et al. Syzygium cumini (L.) skeels: a prominent source of bioactive molecules against cardiometabolic diseases. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.

COSTANTINI, D.; MARASCO, V.; MØLLER, A. P. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 181, n. 4, p. 447-456, 2011. ISSN 0174-1578.

COUTINHO, W. F.; JÚNIOR, W. S. S. Diabetes care in Brazil. **Annals of global health**, v. 81, n. 6, p. 735-741, 2015. ISSN 2214-9996.

CZERSKA, M. et al. Today's oxidative stress markers. **Medycyna pracy**, 2015. ISSN 0465-5893.

DING, Y. et al. Myricetin protects against cytokine-induced cell death in RIN-m5f β cells. **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 8, p. 733-740, 2012. ISSN 1096-620X.

ESSICK, E. E. et al. Adiponectin modulates oxidative stress-induced autophagy in cardiomyocytes. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68697, 2013. ISSN 1932-6203.

FREEDMAN, B. D. et al. A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor- γ knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 17118-17125, 2005. ISSN 0021-9258.

FUSI, F. et al. L-type Ca^{2+} channels activation and contraction elicited by myricetin on vascular smooth muscles. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 368, n. 6, p. 470-478, 2003. ISSN 0028-1298.

GUÉRAUD, F. et al. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 44, n. 10, p. 1098-1124, 2010. ISSN 1071-5762.

GUO, L. et al. Identification of novel bioactive aldehyde-modified phosphatidylethanolamines formed by lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 6, p. 1226-1238, 2012. ISSN 0891-5849.

GUPTA, R. K. et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A. **Asian Pac Cancer Prev**, v. 15, p. 4405-4409, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015. ISBN 0198717482.

HIGUCHI, M. et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. **Stem cells and development**, v. 22, n. 6, p. 878-888, 2012. ISSN 1547-3287.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox biology**, v. 1, n. 1, p. 244-257, 2013. ISSN 2213-2317.

KANETO, H.; MATSUOKA, T.-A. Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature β -cell function. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 3, p. 6281-6297, 2015.

KING, A. J. The use of animal models in diabetes research. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 3, p. 877-894, 2012. ISSN 1476-5381.

LE LAY, S. et al. Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014. ISSN 1942-0900.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, n. 2, p. 216-226, 2008. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-007-0886-7> >.

LENZEN, S.; DRINKGERN, J.; TIEDGE, M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 463-466, 1996. ISSN 0891-5849.

LI, A.-N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, 2014.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DÍAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2017. ISSN 0223-5234.

LUSHCHAK, V. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stresses and their classifications. **Ukr Biochem J**, v. 87, n. 6, p. 11-8, 2015.

MODUN, D.; GIUSTARINI, D.; TSIKAS, D. Nitric oxide-related oxidative stress and redox status in health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, p. 3, 2014. ISSN 1942-0900.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BAZ, F. K. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **Plos one**, v. 8, n. 4, p. e60269, 2013. ISSN 1932-6203.

MORGAN, D. et al. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. **Diabetologia**, v. 50, n. 2, p. 359-369, 2007. ISSN 0012-186X.

NATH, S.; GHOSH, S. K.; CHOUDHURY, Y. A murine model of type 2 diabetes mellitus developed using a combination of high fat diet and multiple low doses of streptozotocin treatment mimics the metabolic characteristics of type 2 diabetes mellitus in humans. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 84, p. 20-30, 2017. ISSN 1056-8719.

NEWSHOLME, P. et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 24, p. 4527-4550, 2016. ISSN 0264-6021.

NEWSHOLME, P. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. **The Journal of physiology**, v. 583, n. 1, p. 9-24, 2007. ISSN 1469-7793.

NUNES, E. A. et al. Glucose intolerance induced by glucocorticoid excess is further impaired by co-administration with β -hydroxy- β -methylbutyrate in rats. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 38, n. 11, p. 1137-1146, 2013. ISSN 1715-5312.

OGURA, S.; SHIMOSAWA, T. Oxidative stress and organ damages. **Current hypertension reports**, v. 16, n. 8, p. 1-5, 2014. ISSN 1522-6417.

OLIVEIRA, A. C. P. et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005. ISSN 0378-8741.

PEREZ, A. et al. Glucocorticoid-induced hyperglycemia (糖皮质激素诱导的高血糖). **Journal of diabetes**, v. 6, n. 1, p. 9-20, 2014. ISSN 1753-0407.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015. ISSN 0223-5234.

PRENTKI, M.; MADIRAJU, S. M. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet β -cell function in health, obesity and diabetes. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 353, n. 1, p. 88-100, 2012. ISSN 0303-7207.

PROTZEK, A. O. P. et al. Hyperinsulinemia caused by dexamethasone treatment is associated with reduced insulin clearance and lower hepatic activity of insulin-degrading enzyme. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 155, p. 1-8, 2016. ISSN 0960-0760.

RADÁK, Z. et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 1, p. 69-74, 1999. ISSN 0891-5849.

RAFACHO, A. et al. High doses of dexamethasone induce increased β -cell proliferation in pancreatic rat islets. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E681-E689, 2009. ISSN 0193-1849.

RAFACHO, A. et al. Functional alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. **Pancreas**, v. 36, n. 3, p. 284-293, 2008. ISSN 0885-3177.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoids in vivo induce both insulin hypersecretion and enhanced glucose sensitivity of stimulus-secretion coupling in isolated rat islets. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 85-95, 2010. ISSN 0013-7227.

RAFACHO, A. et al. Glucocorticoid treatment and endocrine pancreas function: implications for glucose homeostasis, insulin resistance and diabetes. **Journal of Endocrinology**, v. 223, n. 3, p. R49-R62, 2014. ISSN 0022-0795.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567-575, 2011. ISSN 0891-5849.

RAO, R.; MØLLER, I. M. Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. **Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4166-4173, 2011. ISSN 1615-9861.

RAVI, K.; RAMACHANDRAN, B.; SUBRAMANIAN, S. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Life sciences**, v. 75, n. 22, p. 2717-2731, 2004. ISSN 0024-3205.

RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; SIMENTAL-MENDÍA, L.; GUERRERO-ROMERO, F. The triglyceride and glucose index is useful for recognising insulin resistance in children. **Acta Paediatrica**, v. 106, n. 6, p. 979-983, 2017. ISSN 1651-2227.

ROMA, L. P. et al. N-acetylcysteine protects pancreatic islet against glucocorticoid toxicity. **Redox Report**, v. 16, n. 4, p. 173-180, 2011. ISSN 1351-0002.

SANCHES, J. R. et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium l-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, 2016.

SAVINI, I. et al. Obesity-associated oxidative stress: strategies finalized to improve redox state. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 5, p. 10497-10538, 2013.

SEMWAL, D. K. et al. Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 90, 2016.

SHARMA, A. K. et al. Syzygium cumini ameliorates Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction via modulation of PPAR γ , Dyslipidemia, Oxidative Stress, and TNF- α in Type 2 Diabetic rats. **Journal of pharmacological sciences**, v. 119, n. 3, p. 205-213, 2012. ISSN 1347-8613.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from Eugenia jambolana seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376-2383, 2008. ISSN 0278-6915.

SHARMA, S. B. et al. Ameliorative effect of active principle isolated from seeds of Eugenia jambolana on carbohydrate metabolism in experimental diabetes. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011. ISSN 1741-427X.

SINGH, N.; GUPTA, M. Effects of ethanolic extract of Syzygium cumini (Linn) seed powder on pancreatic islets of alloxan diabetic rats. 2007. ISSN 0975-1009.

SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157-1180, 2013. ISSN 0340-5761.

SRIVASTAVA, S.; CHANDRA, D. Pharmacological potentials of Syzygium cumini: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013. ISSN 1097-0010.

TEIXEIRA, C. C. et al. Absence of antihyperglycemic effect of jambolan in experimental and clinical models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1, p. 343-347, 2000. ISSN 0378-8741.

TIWARI, B. K. et al. Markers of oxidative stress during diabetes mellitus. **Journal of Biomarkers**, v. 2013, 2013. ISSN 2090-8660.

TRIPATHI, A. K.; KOHLI, S. Pharmacognostical standardization and antidiabetic activity of Syzygium cumini (Linn.) barks (Myrtaceae) on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 11, n. 2, p. 71-81, 2014. ISSN 1553-3840.

TZENG, T.-F.; LIOU, S.-S.; LIU, I.-M. Myricetin ameliorates defective post-receptor insulin signaling via β -endorphin signaling in the skeletal muscles of fructose-fed rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011. ISSN 1741-427X.

UPADHYAY, S.; DIXIT, M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2015, 2015. ISSN 1942-0900.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725.

WANG, Q. et al. Myricetin suppresses differentiation of 3 T3-L1 preadipocytes and enhances lipolysis in adipocytes. **Nutrition Research**, v. 35, n. 4, p. 317-327, 2015. ISSN 0271-5317.

WINTERBOURN, C. C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 164-170, 2015. ISSN 0891-5849.

WU, J.; YAN, L.-J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic β cell glucotoxicity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 8, p. 181, 2015.

YE, Z.-W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1850, n. 8, p. 1607-1621, 2015. ISSN 0304-4165.

ZHENG, N. et al. Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from Syzygium jambos seeds and optimization by response surface methodology. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 21, p. 2411-2419, 2011. ISSN 1996-0816.

ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 22
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 22/14 Nº do Protocolo: 23115.015295/2014-31 Data de entrada no CEUA: 17/10/2014 Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto: AÇÕES DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS NA MODULAÇÃO DA SECREÇÃO DE INSULINA EM MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERGLICEMIA EM RATOS.		
Identificação da equipe executora: Profa. Dra. Ana Paula Gameiro Cappelli (coordenador), Prof. Dr. Antonio Marcus de A. Paes (colaborador), Iracelle Carvalho Abreu (colaborador), Everardo Magalhães Carneiro (colaborador)		
Instituição onde será realizado: Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 25/10/14
Cooperação estrangeira: não		Data de devolução 25/01/15

II – Objetivos:

Avaliar os efeitos metabólicos de *Averrhoa carambola* L. Em modelo experimental de hiperglicemia em ratos.

III – Sumário do projeto:

O projeto apresenta proposta de avaliar o papel do tratamento com *A. carambola* no contexto de disfunção metabólica glicêmica (hiperglicemia induzida por glicocorticoide).

Serão utilizados 30 animais, ratos, Wistar, machos, adultos (60 dias). Os animais serão divididos em 3 grupos: um normoglicêmico (controle – xarope) e dois hiperglicêmicos (predinisona e predinisona + extrato vegetal). Após a indução do diabetes, os animais serão submetidos à teste de tolerância à glicose, teste de tolerância à insulina e avaliação laboratorial (dosagem bioquímica – glicemia e insulina em jejum, colesterol total, triglicérides, HDL). Além disso, será realizada a avaliação de secreção estática de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas.

IV – Comentário do relator frente à resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre:

O projeto é conciso e segue as normas da resolução No 779 – CONSEPE. Os animais estarão sob condições de estresse controladas, mas não propositais. A metodologia de eutanásia está dentro das normas éticas seguidas pela Universidade Federal do Maranhão.

V – Pendências

O projeto não apresenta pendências em relação à sua metodologia, cronograma ou mesmo descrição do uso dos animais.

VI – Recomendações:

Revisar o texto da metodologia, com o propósito de deixa-lo mais claro em relação aos tempos de tratamento. A metodologia especifica que os animais serão “tratados por via oral durante 30 dias”. No entanto, não especifica se o tratamento será diário ou com intervalos, assim como não explicita se todos os tratamentos (xarope, predinisona e extrato) serão efetuados durante todo o período ou apenas um deles.

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto apresentado é de grande relevância para a sociedade atual, pois a incidência de diabetes vem aumentando, mesmo com as campanhas ativas para o cuidado e prevenção. É um projeto importante, pois traz uma possibilidade para o desenvolvimento de alternativa no tratamento do diabetes. Uma vez que obedece as normas éticas para sua execução, o presente projeto está **aprovado** pela CEUA.

São Luís, _____ 11 _____ / _____ maio _____ / _____ 2015 _____



Profa Dra Lucilene Amorim

Silva Presidente do CEUA /

UFMA

