

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

**INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Azadirachta indica A. Juss SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, COGNITIVOS E MOTORES DE RATOS COM
SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM
SACAROSE**

THAIANE COELHO DOS SANTOS

São Luís – MA
2018

THAIANE COELHO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Azadirachta indica A. Juss **SOBRE PARÂMETROS**
COMPORTAMENTAIS, COGNITIVOS E MOTORES EM RATOS COM
SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM
SACAROSE

Dissertação de mestrado da discente Thaiane coelho dos santos no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio
Marcus de Andrade Paes

São Luís – MA

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

COELHO DOS SANTOS, THAIANE.

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Azadirachta indica A. Juss SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, COGNITIVOS E MOTORES EM RATOS COM
SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM SACAROSE /
THAIANE COELHO DOS SANTOS. - 2018.

67 f.

Orientador(a): ANTONIO MARCUS DE ANDRADE PAES.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
sao luis, 2018.

1. Azadirachta indica A. Juss. 2. Dieta rica em
sacarose. 3. Síndrome Metabólica. I. MARCUS DE ANDRADE
PAES, ANTONIO. II. Título.

THAIANE COELHO DOS SANTOS

INVESTIGAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE
Azadirachta indica A. Juss **SOBRE PARÂMETROS**
COMPORTAMENTAIS, COGNITIVOS E MOTORES EM RATOS COM
SÍNDROME METABÓLICA INDUZIDA POR DIETA RICA EM
SACAROSE

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

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof Dr. Antonio Carlos Romão Borges
Universidade Federal do Maranhão

Profa Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

*“Penso 99 vezes e nada descubro.
Deixo de pensar, mergulho no
silêncio, e a verdade me é revelada”*

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Eu certamente sou uma entusiasta quando se trata de ciência. Para mim, cientistas são verdadeiros exemplos do quanto nossa capacidade cognitiva pode nos fazer transpor o que se pensava ser impossível e intangível, nos “categorizando” verdadeiramente como seres evoluídos. Acredito também que na verdade a ciência nos aproxima de Deus, pois nos faz ter “a mente de Deus” e isto é simplesmente maravilhoso. Neste âmbito, expandir o conhecimento científico às massas e contagiá-las com a mente científica é certamente algo que eu quero fazer enquanto eu tiver fôlego de vida. Tendo em vista este meu propósito em construção, fazer parte da equipe do Laboratório de fisiologia experimental (LeFisio) muito agregou e vem agregando à minha formação. Citando Issac Newton posso dizer com convicção que se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes.

Agradeço ao meu orientador **Antonio Marcus de Andrade Paes** por ser uma de minhas fontes de inspiração, por todos os ensinamentos como líder, como cientista e posso dizer também que como pai. Com sua visão, mente científica e com seu jeito peculiar, tens contribuído com a formação de excelentes profissionais. Eu só sei ser grata por cada “puxão de orelha” que me destes. Eu tentei ao máximo, mesmo com minha memória limitada, captar tudo que querias passar e certamente lhe digo que não foram em vão. Muito obrigada prof. Marcus! Conte sempre comigo.

Agradeço à minha orientadora **Adriana Leandro Camara** por ter dito sim para mim. A senhora foi quem primeiro me deu uma chance de desenvolver meus talentos, quem me permitiu ir atrás de objetivos sempre maiores e sempre esteve presente. Não desenvolvi habilidades com patentes (vacilo), mas saibas que tenho enorme admiração por seu talento e desenvoltura. Muito obrigada profa. Adriana! Conte sempre comigo.

Agradeço ao meu orientador **Bruno Araújo Serra Pinto**, sim, eu tenho três orientadores, pasmem! Você foi meu suporte, alicerce e posso dizer que um dos meus portos seguros. Fico imensamente feliz de ver teus talentos acadêmicos/científicos aflorando de uma forma tão notória comprovado pelo ganho de espaço cada vez mais significativo para as neurociências no laboratório. Parabéns e muito obrigada prof. Bruno! Conte sempre comigo.

Agradeço à minha família, pois absolutamente tudo, tudo mesmo do que eu conquistei até hoje eu devo a vocês meus pais **Telma Coelho dos Santos e Domingos dos Santos**. Os estudos foram meu pilar pra subir níveis na vida e foram vocês quem me deram inicialmente esta visão, apesar das suas próprias limitações. Eu os amo imensamente e saibam que tudo o que eu faço, eu faço por nós. Espero sempre retribuir tudo em igual ou maior medida. Vocês merecem! Muito obrigada Mamis e Papis!

Agradeço à minha irmã **Thamires coelho dos santos**, por sua amizade e por sempre de alguma forma tentar me ajudar, até mesmo experimentalmente. Tua visão de futuro e maturidade frente à vida são plausíveis e admiráveis. Grata por teu incentivo a ter sonhos grandiosos. Eu te amo, muito obrigada Mirinha!

Agradeço ao meu amorzineo **André de Sousa Muniz**, por ser meu amortecedor frente às dificuldades da vida. Tu estás entre os meus maiores incentivadores e isto funciona como uma força propulsora adicional para que eu continue com firmeza a jornada. Trilhar a estrada ao teu lado tem sido indescritível. Só sei ser grata por tua amizade, companheirismo e amor. Eu te amo, muito obrigada Gurizinho!

Agradeço ao amigo de pesquisa **Péricles Nunes**, por ser meu instrutor e companheiro de laboratório. Sua perspicácia, criatividade e inteligência são estupendas. Aprendi muito com você e certamente fostes essencial para elevar o grau de qualidade da parte química de nosso projeto. Conte sempre comigo. Muito obrigada prof. Péricles!

Agradeço às minhas amigas **Savanna Carsi e Yasmin Campos**, pelo companheirismo nos dias “trevosos”. Eu estava sozinha e Deus as colocou para serem minhas ajudadoras no cuidado daqueles trequinhos peraltas (ratos). Nem todas as batatas e sushis no mundo pagariam (ou pagariam? Kkkkkk) o que fizeram por mim, não uma ou duas vezes, mas em todos os momentos. Amo vocês, muito obrigada gatinhas!

Agradeço à professora **Cláudia Rocha** pela paciência, suporte e orientações. Você me deu luz em muitos momentos escuros e me mostrou como é lindo ver mulheres fortes, inteligentes e fenomenais na ciência.

Agradeço à amiga **Thamyres Cristhina** pelo ombro amigo nos dias bons e maus (Te amo migs!). À amiga **Rosangela Sousa (“Bem”)**, por sua disposição, ensinamentos e apoio; A **Vinycius Teles** pelo auxílio e paciência em me explicar várias vezes determinados cálculos; a todos os meus babys **IC’s (sugardos)**, pelas risadas e multirões no GTT/ITT, em especial a **Mariana Uchoa** pelas conversas de whatsapp quando as coisas queriam desandar (<3); ao amigo **Antonio Leite** pelo auxílio em um dos meus testes até tarde da noite em final de semana; À amiga **Thaís Gomes** pelas conversas científicas, apoio experimental e disponibilidade, apesar da correria; ao amigo **Darleno Camelo** pelos memes nos dias difíceis e cansativos; às amigas **Jenny Kelma** e **Roseanne Bressan** pela amizade e apoio mesmo estando longe; e a toda a **equipe do laboratório** que aceitaram minhas sugestões de tarefa para concretização deste projeto e as cumpriram com maestria.

Muito obrigada “limbdos”!

RESUMO

Introdução: O consumo excessivo de açúcares adicionados contribui diretamente para o crescimento epidêmico da Síndrome Metabólica (SM), que está associada ao declínio cognitivo tardio, às alterações neurocomportamentais e ao comprometimento motor severo. Para prevenir estes danos, terapias complementares, incluindo várias plantas medicinais, foram extensivamente investigadas. Nesse contexto, hipotetizamos que o extrato hidroetanólico da folha de *Azadirachta indica* (EHFN), cuja composição química lhe confere atividades hipoglicemiante, antioxidante e anti-inflamatória, tem o potencial de retardar ou prevenir déficits metabólicos, cognitivos, comportamentais e motores em ratos.

Objetivo: Investigar os efeitos do tratamento com o EHFN sobre parâmetros metabólicos e neurocomportamentais de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose. **Métodos:** Ratos Wistar com 21 dias de vida (desmame) foram divididos em 2 grupos, um alimentado com dieta padrão (CTR, n = 14) e outro alimentado com dieta rica em sacarose (DRS, n = 14) durante 20 semanas. Após este período foram subdivididos em quatro grupos que continuaram com suas respectivas rações por mais 4 semanas com concomitante tratamento v.o com água ou EHFN (300 mg/kg/dia por 30 dias), sendo os grupos denominados CTR (n = 7), alimentados com dieta padrão; CTRT (n = 7), alimentado com dieta padrão mais EHFN; DRS (n = 7) alimentado com dieta de sacarose e DRST (n = 7) alimentado com sacarose mais EHFN. Avaliou-se o efeito do extrato sobre o perfil morfométrico (peso, depósito de gordura, índice de Lee, consumo alimentar), bioquímico (glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total), resistência insulínica (TyG), cognição (Labirinto aquático de Morris), motricidade (Rotarod) e comportamento (nado forçado). **Resultados:** a DRS induziu um fenótipo com SM, caracterizado pela obesidade central, hipertrigliceridemia e resistência à insulina. Os animais HSD também apresentaram déficit motor significativo sem comprometimento cognitivo. O tratamento com EHFN promoveu redução significativa de gordura periepídimal, mesentérica, retroperitoneal, bem como hipertrigliceridemia atenuada de animais HSDT, enquanto nenhum efeito foi observado no grupo CTRT. No entanto, o tratamento EHFN restaurou completamente o desempenho de ratos HSD-T no rotarod, sugerindo um importante efeito protetor neuromotor. **Conclusão:** Este estudo reforça que o consumo precoce de dieta rica em sacarose leva a alterações metabólicas tardias em paralelo a danos motores severos. O tratamento com EHFN promoveu atividade lipolítica, atenuação da hipertrigliceridemia e significativa proteção neuromotora. Em parte, essas ações biológicas são atribuídas à mistura de polifenóis encontrados na folha de *A. indica*, apoiando o uso dessa espécie de planta como ferramenta terapêutica complementar.

Palavras-chave: *Azadirachta indica* A. Juss; Síndrome Metabólica; Dieta rica em sacarose.

ABSTRACT

Background: The excessive consumption of added sugars directly contributes to the epidemic Metabolic Syndrome (MS), which is associated with late-in- life cognitive decline, neurobehavioral changes and severe motor impairment. In order to prevent these damages, complementary therapies, including several medicinal plants, have been extensively investigated. In this context, we hypothesized that the hydroethanolic extract of *Azadirachta indica* leaf (HEAL), whose chemical composition confers it hypoglycemic, antioxidant and anti-inflammatory activities, has the potential to delay or prevent metabolic, cognition, behavioral and motor deficits in MS rats. **Methods:** Weaned Wistar rats were randomized into 2 groups: Control (CTR), fed a standard chow, and High-Sucrose Diet (HSD), fed a high-sucrose diet. At 150 days of life, each group was split into 2 new groups, resulting in 4 groups: CTR, CTR-T, HSD and HSD-T, where T means those animals were orally treated with (300 mg/Kg/day) for 30 days, meanwhile their controls received tap water (1 mL/Kg/day). At the end of the treatment, morphometric profile (body weight, fat deposition, Lee index, food intake), insulin resistance (TyG), cognition (Morris water maze test), motor (rotarod) and behavioral parameters (forced swimming) were assessed. **Results:** HSD induced a MS phenotype, which was characterized by central obesity, hypertriglyceridemia and insulin resistance. HSD animals also showed significant motor deficit without cognitive impairment. HEAL treatment promoted significant reduction of periepididymal, mesenteric, retroperitoneal fat pads, as well as attenuated hypertriglyceridemia of HSD-T animals, meanwhile no effect was observed in CTR-T group. Notwithstanding, HEAL treatment completely restored the performance of HSD-T rats on rotarod, suggesting an neuromotor protective effect. **Conclusions:** This study reinforces that childhood consumption of high-sucrose diet leads to late-in-life metabolic alterations in parallel with severe motor damage. The treatment with HEAL promoted lipolytic activity, attenuation of hypertriglyceridemia as well as significant neuromotor protection. In part, these biological actions are attributed to the mixture of polyphenols found in the leaf of *A. indica*, supporting the use of this plant species as a complementary therapeutic tool.

Keywords: *Azadirachta indica* A. Juss; Metabolic syndrome; High sucrose diet.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Síndrome Metabólica: Definição, causas e fisiopatologia.....	18
2.2	Modelos dietético de indução de desordens neurais.....	24
2.3	Terapia complementar para doenças neurodegenerativas.....	24
2.4	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Nim).....	28
3.	OBJETIVO GERAL.....	31
3.1	Objetivos específicos.....	31
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1	Preparo do Extrato Hidroalcoólico das Folhas do Nim Indiano, <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (EHFN).....	32
4.2	Avaliação de polifenóis totais a atividade antioxidante do EHFN..	32
4.3	Animais.....	33
4.4	Dieta rica em sacarose.....	33
4.5	Abordagem experimental.....	33
4.6	Avaliação cognitiva, motora e comportamental.....	35
4.6.1	Avaliação cognitiva.....	35
4.6.2	Avaliação motora.....	36
4.6.3	Avaliação comportamental.....	37
4.7	Análise estatística dos dados.....	37
5.	RESULTADOS	38
5.1	EHFN possui polifenóis e atividade antioxidante.....	38
5.2	O tratamento com EHFN atenua alterações metabólicas em animais com fenótipo obesogênico.....	38
5.3	O tratamento com EHFN promove melhores curvas de aprendizado e previne danos neuromotores em animais com fenótipo obesogênico.	40
6.	DISCUSSÃO.....	43

7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AChE	Acetilcolinesterase
Akt	Proteína quinase
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BuChE	Butirilcolinesterase
CTR	Controle
CTR^T	Controle tratado com EHFN
DA	Doença de Alzheimer
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DN,S	Doenças Neurodegenerativas
DRS	Dieta rica em sacarose
DRST	Dieta rica em sacarose tratados com EHFN
EHFN	Extrato hidroalcoólico das folhas de Nim
FoxO1	Forkhead box protein O1
GLUT	Receptor de glicose
IDF	International Diabetes Federation
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
RI	Resistência insulínica
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SM	Síndrome Metabólica
SREBP-1	Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol
TNF-α	Fator de Necrose tumoral
TyG	Índice TyG (triglicerídeos/glicose)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ações da insulina em tecido insulino-dependentes.....	20
Figura 2	Vias de sinalização insulínica no fígado.....	21
Figura 3	Ações da insulina em tecido insulino-dependentes com RI...	22
Figura 4	Sinalização do receptor de insulina no cérebro.....	24
Figura 5	<i>Azadirachta indica</i> (árvore, folhas e frutos).....	28
Figura 6	Delineamento experimental geral.....	38
Figura 7	Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> (EHFN) sobre parâmetros morfométricos.....	39
Figura 8	Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> (EHFN) sobre parâmetros bioquímicos.....	40
Figura 9	Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> (EHFN) sobre a cognição ao teste do Labirinto aquático de Morris.....	41
Figura 10	Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> (EHFN) sobre a função motora no teste de rotarod.....	42
Figura 11	Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> (EHFN) sobre o comportamento no teste de nado forçado.....	42

1. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) refere-se à co-ocorrência de várias alterações metabólicas como a resistência à insulina, obesidade, dislipidemia aterogênica e hipertensão, que contribuem diretamente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (Alberti *et al.*, 2009). Levantamentos epidemiológicos demonstram que cerca de 1/4 da população mundial apresenta SM e que este crescimento é influenciado diretamente por variáveis como genética, idade, gênero, etnia, perfil sócio-econômico, estilo de vida e padrões nutricionais hipercalóricos e/ou com maior presença de carboidratos e lipídeos (Desroches e Lamarche, 2007; Kolovou *et al.*, 2007; Saklayen, 2018).

Notoriamente, uma série de evidências tem demonstrado que o aumento no consumo de açúcares de adição ao longo das últimas décadas, dentre eles a sacarose e o xarope de milho rico em frutose, contribuem diretamente para o crescimento em proporções epidêmicas das desordens metabólicas associadas à SM (Bray *et al.*, 2004; Tappy, 2018). Dentre as principais complicações metabólicas em ratos que consumiram de forma excessiva o macronutriente sacarose estão a obesidade central (Toida *et al.*, 1996), dislipidemia aterogênica com destaque para a hipetrigliceridemia (Pagliassotti *et al.*, 1996; Pinto *et al.*, 2016a), esteatose hepática (Steneberg *et al.*, 2015), hiperglicemia e resistência insulínica (Pagliassotti *et al.*, 2002).

Adicionalmente, estudos têm demonstrado que além de efeitos sobre o metabolismo, o consumo excessivo de sacarose está relacionado a ações deletérias sobre o cérebro, favorecendo o surgimento de declínio cognitivo e demência precoce tanto em animais (Stranahan *et al.*, 2008) quanto em humanos (Ye *et al.*, 2011). Dentre os possíveis mecanismos pelos quais o consumo de sacarose leva ao declínio cognitivo, estão a neuroinflamação (Beilharz *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2015) e a redução de fatores essenciais para neuroplasticidade como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Molteni *et al.*, 2002).

Dentre os contribuintes metabólicos que culminam nestes processos em nível de sistema nervoso central estão os altos níveis de triglicerídeos (lipotoxicidade) (Agrawal e Gomez-Pinilla, 2012), estresse oxidativo (Carvalho *et al.*, 2012) e a resistência insulínica (Calvo-Ochoa *et al.*, 2014).

Em achados prévios do nosso grupo de pesquisa, constatou-se que o consumo precoce e sustentado à dieta rica em sacarose (25%) por 12 semanas é capaz de promover em ratos diversas alterações metabólicas como obesidade central, aumento dos níveis séricos de triglicerídeos, hiperglicemia e resistência insulínica, bem como alterações neurocomportamentais como déficits motores e ansiedade e sugeriram que todas estas alterações se deram em virtude de estresse oxidativo e de estresse do retículo endoplasmático em nível hipocampal (Pinto *et al.*, 2016a). Entretanto, neste estudo supracitado nenhuma intervenção terapêutica foi realizada visando a atenuação/reversão dos efeitos deletérios observados.

Tendo em vista o crescimento em proporções epidêmicas dos fatores de risco da SM bem como das diversas demências neurodegenerativas associadas à síndrome metabólica, a busca por formas seguras e eficazes de controle/tratamento destas condições patológicas se tornam de suma importância e, neste contexto, as plantas medicinais assumem um papel relevante (Zhang *et al.*, 2015).

As plantas medicinais e seus metabólitos secundários ativos apresentam algumas vantagens frente aos medicamentos sintéticos usuais, visto que possuem boa aceitação popular, são de fácil acesso e não contam com os diversos efeitos colaterais e reações adversas associados ao uso irracional dos medicamentos sintéticos (Rates, 2001). Das mais diversas classes de metabólitos ativos encontrados em espécies vegetais, os polifenóis se destacam no controle e prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis (Zhang *et al.*, 2015).

Estudos sugerem que os polifenóis sejam úteis na modulação de processos patofisiológicos associados com a SM, dentre eles, por exemplo, compostos como o resveratrol e a quercetina que diminuem os níveis séricos de lipídios em roedores ao promoverem redução da incorporação destes em adipócitos, retardam a conversão de glicose em lipídios além de melhorarem quadros inflamatórios e sensibilidade insulínica (Baur *et al.*, 2006; Szkudelska *et al.*, 2009; Cherniack, 2011).

Adicionalmente, dados da literatura demonstram que os polifenóis podem exercer efeitos diretos sobre o sistema nervoso central ao atravessarem a barreira hematoencefálica e promoverem plasticidade sináptica em regiões importantes para a consolidação de memórias (Marles e Farnsworth, 1995; Briskin, 2000; Tabassum e Ahmad, 2011; Wang *et al.*, 2013; Kooti *et al.*, 2016; Vauzour, 2017).

No presente estudo investigamos o potencial terapêutico da espécie vegetal *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como Nim e amplamente distribuída no Estado do Maranhão e que possui inúmeras atividades biológicas dentre as quais destacamos a antiinflamatória (Umar *et al.*, 2014), antioxidante (Alzohairy, 2016) e redução da glicemia (Kaur *et al.*, 2011) além de efeitos em nível de sistema nervoso central com ações ansiolíticas (Singh *et al.*, 1980) e neuroprotetoras (Yanpallewar *et al.*, 2005; Raghavendra *et al.*, 2013). Possivelmente estas ações são conferidas a compostos como os polifenóis como constatado em estudos químicos por nós realizados indicando que o extrato hidroalcoólico das folhas de Nim (EHFN) possui composição química rica em metabólitos como a quercetina, quercetina-3-O-glicosídeo, kaempferol-3-O-glicosídeo, miricetina ramnosídeo, rutina e luteonina, dados estes confirmados em achados prévios na literatura (Chattopadhyay, 2003).

Estudos com roedores demonstram que o tratamento com o extrato aquoso das folhas desta espécie é capaz de regular a sinalização e secreção insulínica possivelmente pela ação da quercetina em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina (Kaur *et al.*, 2011). Além disto, constatamos que o EHFN em nível cerebral é capaz de inibir a enzima acetilcolinesterase (dados em submissão), proteína que degrada o neurotransmissor acetilcolina, importante para a consolidação de novas memórias (Hasselmo, 2006). Portanto, a hipótese de nosso trabalho é que o tratamento com EHFN tem ação protetora frente a um perfil metabolicamente disfuncional e com prejuízos neurocomportamentais em animais alimentados com dieta obesogênica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Síndrome Metabólica: Definição, causas e fisiopatologia

A síndrome metabólica caracteriza-se como um conjunto de fatores de riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Estes fatores incluem obesidade, hiperglicemia, dislipidemia aterogênica, resistência insulínica (RI) e hipertensão (Alberti *et al.*, 2009).

Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF) cerca de 20 a 25% da população adulta mundial apresenta esta síndrome e possuem maiores chances de terem um ataque cardíaco ou acidente vascular cerebral e de desenvolver DM2 (Stern *et al.*, 2004; Alberti *et al.*, 2006). A prevalência da SM depende da região, ambiente (rural ou urbano), características da população estudada (sexo, idade, raça e etnia) e da definição diagnóstica utilizada (Desroches e Lamarche, 2007; Kolovou *et al.*, 2007).

Historicamente, as primeiras pesquisas sobre a SM ocorreram por volta de 1920 quando o médico sueco Kylin encontrou correlação entre hipertensão, hiperglicemia e gota (Kylin, 1923). Em 1988 coube a Gerald Reaven explicar pela primeira vez como a resistência insulínica (RI) e a hiperinsulinemia compensatória (aumento do hormônio insulina na corrente sanguínea) poderiam levar a diversas anormalidade metabólicas, DM2 e DCV (Reaven, 2005b).

A definição original proposta por Raven diz que a SM tem como causas a tolerância à glicose, hiperinsulinemia, redução de lipoproteína de alta densidade (HDL), aumento de triglicerídeos e de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e hipertensão arterial (Reaven, 2005b). Desde esta época muitos outros pesquisadores e associações tentaram caracterizar e definir as causas da então nova síndrome.

Em 2005, tanto a *International Diabetes Federation* (IDF) quanto a *American Heart Association / National Heart, Lung e Blood Institute* (AHA / NHLBI) (Grundy *et al.*, 2005) tentaram conciliar as diferentes definições clínicas já existentes e a SM ficou configurada como uma interconexão de fatores fisiológicos, bioquímicos, metabólicos e clínicos que aumentam drasticamente o risco para DCV e DM2 (Alberti *et al.*, 2006; Alberti *et al.*, 2009).

Dentre os principais fatores estão a resistência insulínica, obesidade visceral, dislipidemia aterogênica, disglicemia, estado pró-inflamatório e trombótico, fatores hormonais e hipertensão e o diagnóstico da doença é confirmado pela presença de 3 a 5 destes fatores instaurados (Alberti *et al.*, 2006).

Hoje é unânime a aceitação quanto ao papel chave da adiposidade abdominal característica da obesidade e a resistência à insulina no processo fisiopatológico da SM, no entanto, a etiologia causal comum desta desordem ainda permanece desconhecida (Alberti *et al.*, 2006; Després *et al.*, 2008; Tran *et al.*, 2008).

A obesidade, uma das principais epidemias do século XXI, caracterizada pela desproporcionalidade do peso em relação à altura com a acumulação excessiva de gordura geralmente acompanhada de inflamação sistêmica aguda ou crônica (Heymsfield e Wadden, 2017). A desregulação do balanço energético culmina em crescente acúmulo de gorduras que dependendo do local de deposição pode ser considerada subcutânea ou visceral (gordura abdominal) (Guilherme *et al.*, 2008).

Pesquisas demonstram que a gordura visceral, especialmente a mesentérica, está correlacionada com o desenvolvimento de anormalidades metabólicas como DM, SM e doenças cardiovasculares (Kotani *et al.*, 1994), isto porque a disfunção do tecido adiposo induz a liberação de adipocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL6, IL-18) e inibição das antiinflamatórias (Cefalu *et al.*, 2015).

Outro fator etiológico de relevância para a SM é a RI. Esta se caracteriza como uma diminuição parcial ou total da sensibilidade à insulina em tecidos sensíveis ao hormônio (fígado, músculo esquelético e tecido adiposo) (Reaven, 2005a). Para o entendimento de como a RI leva a anormalidades metabólicas é imprescindível o entendimento inicial de como a insulina funciona normalmente.

Ao ingerimos alimentos com riqueza de carboidratos, por exemplo, o elevado nível de glicose circulante estimula as células β pancreáticas a produzirem o hormônio insulina que promove ações em tecidos alvos com vistas ao armazenamento de calorias alimentares (Samuel e Shulman, 2016). No tecido adiposo, a insulina suprime a lipólise (menor formação de ácidos graxos) e promove a lipogênese. No músculo esquelético, a insulina aumenta o transporte de glicose, permitindo a entrada de glicose e síntese de glicogênio. No fígado, a insulina

promove síntese de glicogênio e lipogênese *de novo* enquanto também inibe a gliconeogênese (processo de conversão de precursores não glicídicos como lactato, piruvato, glicerol e aminoácidos a glicose) (Ahima, 2010; Samuel e Shulman, 2016; Titchenell *et al.*, 2017) (Figura 1).

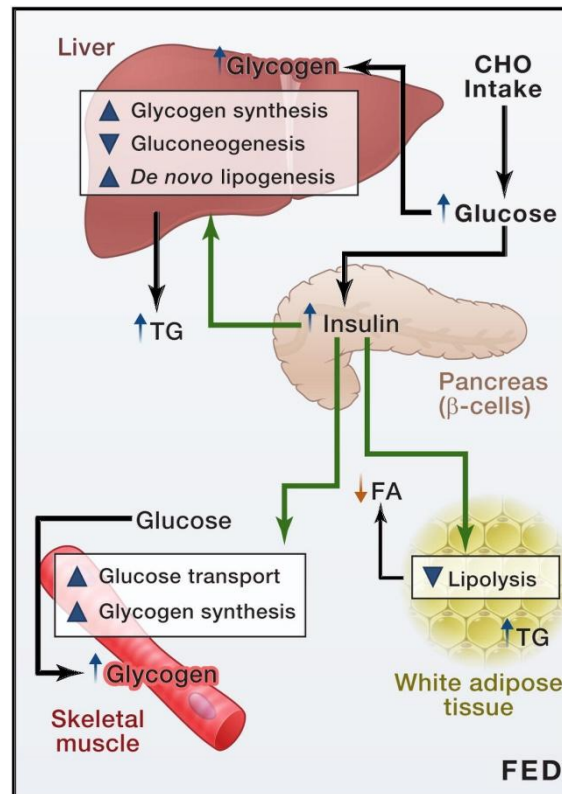


Figura 1. Ações da insulina em tecido insulino-dependentes. **Fonte:** Samuel e Shulman, 2012. FA, ácidos graxos; TAG, triacilglicerol

No fígado, em especial, a regulação dos processos metabólicos ocorre via ativação da Akt (Proteína kinase B). Após ligação da insulina ao receptor (IRS) os substratos deste são recrutados e fosforilados. Ativam o fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K) que fosforila o fosfatidilinositol (4,5) –bisfosfato (PIP2) para gerar fosfatidilinositol (3,4,5) trisfosfato (PIP3). O PIP3 e o mTORC2 (complexo 1 da proteína alvo da rampamicina em mamíferos) são importantes para fosforilar a Akt. Quando ativa culmina com a síntese de glicogênio por vias dependentes e independentes de GSK3 (glicogênio sintase quinase); inibição da expressão de genes gliconeogênicos por fosforilação e inibição de FoxO1 (Caixa O1 de Forkhead); ativação do mTORC1 e as vias de síntese de proteína. Ao ativar mTORC1 e inibir a

FoxO1, esta promove a ativação de SREBP1c e o programa de genes lipogênicos para aumentar a síntese lipídica (Titchenell *et al.*, 2017) (Figura 2)

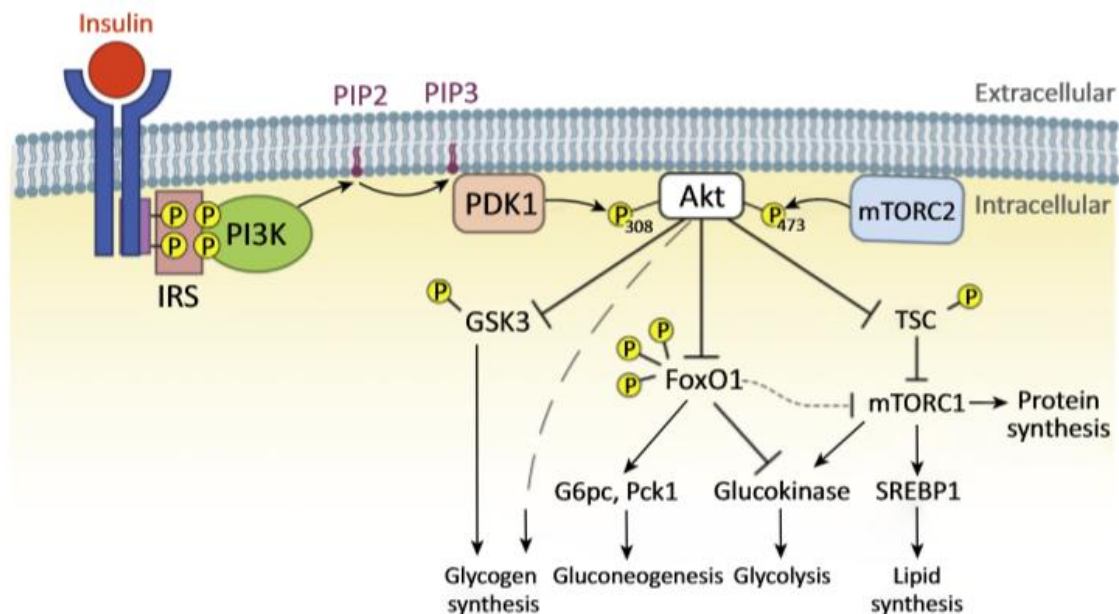


Figura 2. Vias de sinalização insulínica no fígado mediados pela Akt. **Fonte:** Titchenell *et al.*, 2017

Em contrapartida, uma prejudicada sinalização insulínica culmina em dificuldades na absorção de glicose pelo músculo esquelético e desvio desta para o fígado. No fígado, há prejuízos sobre a regulação da gliconeogênese e síntese de glicogênio. A lipogênese permanece inalterada e junto com o aumento da glicose advinda da dieta leva ao aumento da lipogênese.

No tecido adiposo há aumento da lipólise que promoverá a reesterificação de lipídios em outros tecidos (como o fígado) e agrava ainda mais a RI. Juntamente com um declínio nas células β pancreáticas, desenvolve-se hiperglicemia e hiperinsulinemia (Samuel e Shulman, 2016) (Figura 3).

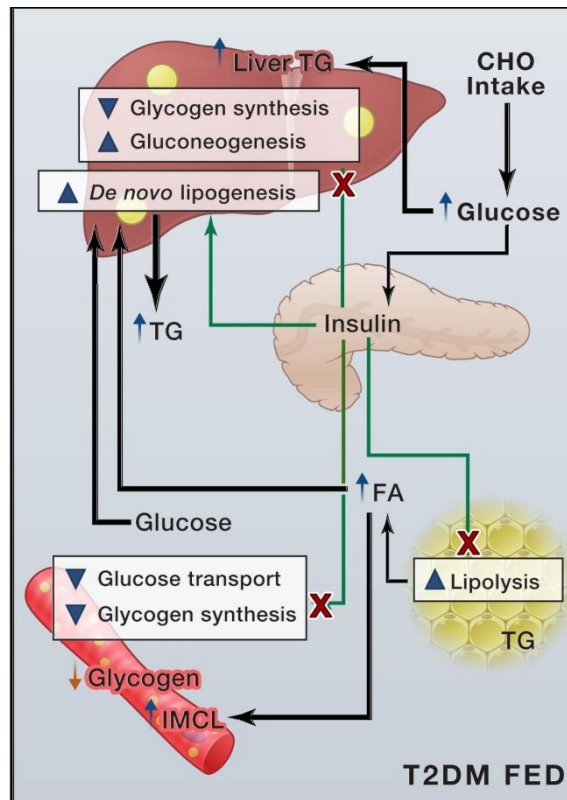


Figura 3. Ações da insulina em tecido insulino-dependentes com RI. **Fonte:** Samuel e Shulman, 2012. FA, ácidos graxos; TAG, triacilglicerol

Dentre os principais mecanismos pelos quais a sobrecarga da secreção de insulina conhecida como hiperinsulinemia leva à RI estão: o excesso de nutrientes ingeridos; *downregulation* da sinalização via Akt (principal cascata de sinalização insulínica); maior aporte de lactato para a gluconeogênese no músculo esquelético de pacientes com obesidade e diabetes (Pories e Dohm, 2012); quadro inflamatório que leva a menor sensibilidade insulínica periférica (Lackey e Olefsky, 2016); consumo de conservantes alimentares como os monoacilglicerídeos (Corkey, 2012); níveis elevados de ácidos graxos circulantes (Stein *et al.*, 1996); formação exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de acil-CoA de cadeia longa (Deeney *et al.*, 2000).

Outros órgãos, apesar de possuírem independência ou menor dependência à insulina, também são afetados com um quadro de RI instaurado. No cérebro, a sinalização de insulina prejudicada e a detecção de nutrientes comprometida, contribuem para a obesidade por não suprimir o apetite. Adicionalmente, estudos epidemiológicos indicam que disfunções metabólicas como comprometimento do

metabolismo da glicose, RI e regulação anormal do apetite (Cai *et al.*, 2012) presentes em pacientes com diabetes, obesidade, pressão alta e/ou aterosclerose são fatores de risco para declínio cognitivo e demência, principalmente a Doença de Alzheimer (DA) (Kivipelto *et al.*, 2006; Camandola e Mattson, 2017).

Apesar da independência, a ativação de receptores IRS no cérebro contribuem para a manutenção da função cognitiva normal. A ativação dos mesmos é similar à que ocorre na periferia. A insulina atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) por difusão facilitada, liga-se aos seus receptores promovendo a autofosforilação da subunidade β e ativa cascata de sinalizações como a via de PI3K-Akt e a via de quinase regulada por sinal MAPK/ERK ((Camandola e Mattson, 2017).

A desregulação da sinalização insulínica em determinados pontos deste processo contribuirão para a RI sendo estes: 1 – diminuição da expressão e transporte de insulina pela BHE; 2 – diminuição da expressão ou atividade do receptor de insulina (IRS); 3 – modulação da fosforilação das proteínas do receptor de insulina (IRS); 4 – diminuição da fosforilação estimulada pelo IRS sobre a Akt; 5 – efeitos sobre a GSK3 β que regula a fosforilação da proteína tau associada aos microtúbulos; 6 – a nível de fatores de transcrição como a FOXO e 7 – efeitos sobre o deslocamento do transportador de glicose sensível à insulina GLUT4 para a membrana plasmática (Figura 4) (Biessels e Reagan, 2015).

Adicionalmente, a RI pode levar a comprometimentos cognitivos por meio também de desregulações mitocondriais, alteração na atividade de receptores AMPA-R e NMDA, importantíssimos para a consolidação de memórias e plasticidade neural, bem como diminuir a via da SREBP-1/SCAP com a diminuição da síntese de colesterol comprometendo as sinapses (Klein e Waxman, 2003).

Evidências crescentes mostram que na interseção etiológica de desordens metabólicas e declínio cognitivo está o crescente aumento do consumo de açúcares de adição, dentre eles a sacarose e o xarope de milho rico em frutose (Luchsinger *et al.*, 2002; Bray *et al.*, 2004; Tappy e Lê, 2010). A frutose, um dos principais componentes da sacarose, possui papel crucial no surgimento de fatores de risco para a SM por levar a hipertensão (Johnson *et al.*, 2007), hipertrigliciridemia

(Angelopoulos *et al.*, 2009), adiposidade visceral (Stanhope *et al.*, 2009) e RI (Gross *et al.*, 2008).

Sobre o cérebro, a sacarose favorece o surgimento de declínios cognitivos e demências precoces (Luchsinger *et al.*, 2002) devido à instalação da RI e estresse oxidativo que levam à redução da gênese, diferenciação e plasticidade sináptica do hipocampo, uma região cerebral crítica para a aprendizagem e a memória (Lakhan e Kirchgessner, 2013).

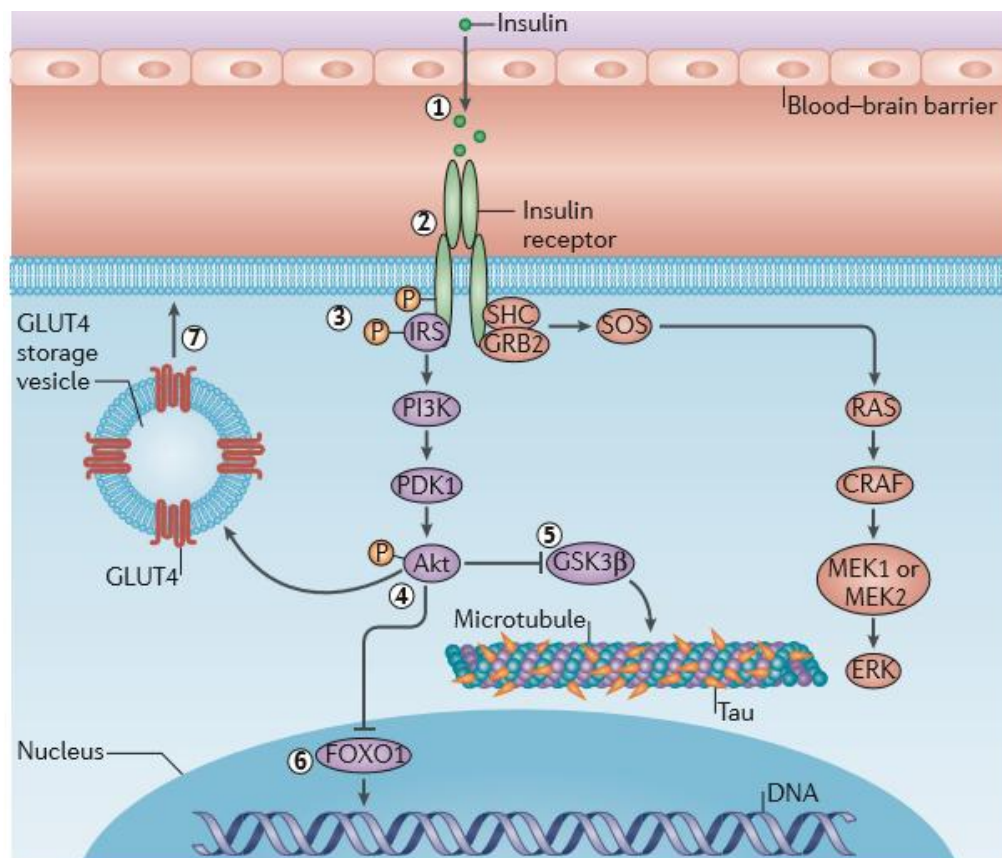


Figura 4. Sinalização do receptor de insulina no cérebro. **Fonte:** Biessels e Reagan, 2015. CRAF, também conhecido como RAF1; GRB2, fator de crescimento ligado ao receptor 2; PDK1, proteína quinase dependente 3-fosfoinositidil-1; IRS, substrato do receptor de insulina

2.2 Modelos dietéticos e o declínio cognitivo

É crescente o número de pesquisas acerca do impacto que dietas ricas em açúcares refinados e/ou gorduras saturadas tem sobre o metabolismo e a cognição (Molteni *et al.*, 2002; Jurdak *et al.*, 2008; Maniam *et al.*, 2016). Estudos epidemiológicos e em modelos animais demonstram que o consumo excessivo destes nutrientes são os responsáveis por anormalidades metabólicas como as

presentes em pacientes com diabetes, obesidade, hipertensão e/ou aterosclerose e que estas são fatores de risco para o declínio cognitivo associado ou não-associado ao hipocampo (Molteni *et al.*, 2002; Stranahan *et al.*, 2008; Camandola e Mattson, 2017).

O hipocampo é particularmente sensível às alterações metabólicas relacionadas a um padrão dietético não balanceado (Gold *et al.*, 2007; Farr *et al.*, 2008). O consumo excessivo e de forma sustentada de alimentos hipercalóricos promove nesta área a redução da expressão de genes envolvidos com a neurogênese e plasticidade (Molteni *et al.*, 2002; Lindqvist *et al.*, 2006; Farr *et al.*, 2008), sendo a neurogênese o processo de formação de novos neurônios e a plasticidade a capacidade de compensar desafios envolvendo mecanismos celulares e moleculares para a formação e manutenção funcional de sinapses, crescimento neuronal e adaptação comportamental (Molteni *et al.*, 2002).

Em suporte a esta afirmativa, tem sido demonstrado que animais alimentados de forma sustentada com dietas ricas em açúcares refinados e/ou gorduras saturadas apresentam pior desempenho em testes que avaliam a cognição, como o teste do labirinto aquático, sendo correlacionados com a redução da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), um importante mediador de memória e aprendizagem (Molteni *et al.*, 2004; Stranahan *et al.*, 2008)

Estas dietas também induzem alterações inflamatórias em modelos animais. Estudos mostram que a ingestão crônica de dietas hipercalóricas tem relação com inflamação hipocampal e déficits de memória (Buckman *et al.*, 2014). Foi demonstrado que o consumo por 1 a 3 dias de dieta rica em gordura é suficiente para induzir ativação microglial e mudanças na expressão de marcadores inflamatórios no hipotálamo. Se o consumo perdurar há o estabelecimento de inflamação crônica, perda neuronal e destruição de células da glia (Morgan *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a literatura registra que prejuízo na utilização de glicose cerebral e no metabolismo energético representam anormalidades que precedem ou acompanham os estágios iniciais de comprometimento cognitivo (Iwango *et al.*, 1980) e os principais mecanismos causais são a deficiência de GLUT1, levando a dificuldades de transporte da glicose para as células neurais (Winkler *et al.*, 2015);

hiperativação da via do AMPK, que levam a perdas dendríticas e prejuízos sinápticos (Mandrekar-Colucci *et al.*, 2012); e disfunção da via mTORc, com consequente desordem mitocondrial e eventual autofagia (Perluigi *et al.*, 2015).

A sinalização insulínica no cérebro, como já anteriormente citado, tem papel crucial para regulação da ingestão alimentar, peso corporal, reprodução e memória e aprendizagem (GREENWOOD E WINOCUR, 2005). A expressão de mRNA do receptor de insulina tendem a aumentar na região CA1 do hipocampo quando há a formação de memória de curto prazo em testes de memória espacial (Greenwood e Winocur, 2001; 2005). Entretanto, alterações da sinalização deste hormônio tornam os neurônios mais vulneráveis a estresse metabólico e acelera a disfunção neuronal associado a uma menor habilidade cognitiva e desenvolvimento de demências, incluindo a DA (Kaplan *et al.*, 2000).

Cerca de 80% de pacientes com DA tem hiperglicemia de jejum ou diabetes com comprometimentos nos lobos parietal, temporal e córtex frontal (Mosconi, 2013). Levando isto em consideração, pesquisadores inclusive denominam a DA como um “Diabetes tipo 3” (Suzanne, 2009).

As propriedades medicinais de plantas na forma de extratos puros ou isolados têm sido extensivamente pesquisadas com vistas ao tratamento de DN's por diversas vias de ação (Owuor e Kong, 2002). Neste âmbito, apresentamos a seguir os principais mecanismos de ação e aplicações terapêuticas de espécies vegetais para o tratamento de doenças associadas ao declínio cognitivo.

2.3 Terapias complementares para o controle de doenças neurodegenerativas

As DN's são condições incuráveis e incapacitantes secundárias à perda neuronal progressiva, que leva a dano cerebral crônico e neurodegeneração. A etiologia ainda é desconhecida, embora vários modelos animais demonstrem dano associado à barreira hematoencefálica, agregação protéica, exposição a toxinas e disfunção mitocondrial, que levam ao estresse oxidativo, à inflamação e, consequentemente, morte neuronal (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

Neste âmbito, os extratos de plantas tornaram-se candidatos interessantes como agentes terapêuticos devido às suas propriedades antioxidantes, anti-

inflamatórias e características químicas, sendo os efeitos biológicos sobre o SNC conferidos principalmente à ação de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, alcalóides e terpenos (Pérez-Hernández *et al.*, 2016).

De modo geral os 35 mecanismos de ação de destaque incluem: (i) Absorção de radicais: Principalmente flavonóides e alcalóides por possuírem muitos grupos fenólicos com hidroxila e nitrogênio, respectivamente, agindo como doadores de elétrons sendo excelentes nucleófilos e facilmente reagem como ROS (Yokozawa *et al.*, 2002); (ii) Quelação de cátions de ferro: metabólitos com grupos hidrofílicos reagem com íons Fe^{+2} e os facilmente eliminam (Mello-Filho e Meneghini, 1991); (iii) Modulação de enzimas associadas ao estresse oxidativo: Alguns compostos ativam ou inativam moléculas de sinalização específicas como as da via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases - Proteína-quinases ativadas por mitógenos) evitando assim a proliferação e crescimentos desenfreado de células anormais (Owuor e Kong, 2002).

Entre os anos de 2007 a 2017 as famílias de plantas mais pesquisadas para a prevenção e proteção contra o declínio cognitivo incluíram a Amaryllidaceae, Asteraceae e Lamiaceae seguida pelas Fabaceae, Anacardiaceae e Pinaceae (Dados não publicados – Nossa revisão de literature).

Dentre os compostos isolados que são moduladores de neurotransmissores, os alcalóides sempre foram os mais visados, pois possuem estruturas de nitrogênio complexas que, quando carregadas positivamente, se ligam a sítios ativos de acetilcolinesterase (AChE – enzima que derada a acetilcolina), inibindo-as (Houghton *et al.*, 2004; Hostettmann *et al.*, 2006).

Os principais compostos alcalóides que inibem esta enzima incluem quinolizidinas (como a Huperzina A obtida de *Huperzia serrata*) (Zhao e Tang, 2002), isoquinolinas (como a galantamina obtida de *Galanthus nivalis*) (Marco e Carreiras, 2006) e alcalóides indólicos (Konrath *et al.*, 2013). A galantamina é relatada como sendo mais seletiva para a AChE do que a BuChE ($IC_{50} = 1.995$ e $12.59 \mu M$, respectivamente) (Howes *et al.*, 2003).

A *Huperzia A* também demonstrou ser neuroprotetora contra o fragmento peptídico beta-amiloide 25-53 e a citotoxicidade induzida por radicais livres (Tung *et*

al., 2017) e por atenuar a apoptose pela inibição da via das mitocôndrias-caspases (Zhou e Tang, 2002).

2.5.1 *Azadirachta indica* A. Juss (Nim)

Azadirachta indica, popularmente conhecida como Nim – “a árvore da vida” (Figura 5), é considerada como uma das mais versáteis plantas medicinais por possuir um amplo espectro de atividades biológicas (Gupta *et al.*, 2017).

Em 1992, em relatório da Academia Nacional de Ciências (US), foi considerada como “a árvore que resolveria os problemas globais” por apresentar atividades úteis da agricultura ao tratamento de doenças. Sua classificação taxonômica deu-se em 1830 por De Jussieu. **Ordem** – Rutales; **Subordem** – Rutinae; **Família** – Meliaceae, **Subfamília** – Melioideae, **Tribo** – Melieae, **Gênero** – *Azadirachta*, **Espécie** – *indica*.

A árvore do Nim está presente em cerca de 72 países em todo o mundo, incluindo o Brasil, onde foi introduzido em 1984 (Puri, 2003; Girish e Bhat, 2008). É uma árvore originária da Índia e que possui uma variedade de sinônimos a depender do País, podendo ser chamada de Lilá indiana, Azadirakhta, Margosa, Tamar, Kohomba, Pokok semambu, Dogon yaro, Beyu, dentre outros (Biswas *et al.*, 2002).



Figura 5. *Azadirachta indica* (árvore, folhas e frutos). **Fonte:** <http://www.ppmac.org>

A nimbina foi o primeiro composto isolado a partir do óleo das folhas de Nim e desde então, partindo do interesse de estudar um efeito inseticida, muitos grupos começaram estudos químicos da planta ao que encontraram uma panaceia de atividades biológicas (Alzohairy, 2016).

Mais de 300 compostos já foram isolados e podem ser divididos em duas classes principais como isoprenóides e não-isoprenóides. Os isoprenóides incluem diterpenóides e triterpenóides contendo protomeliácos, limonóides, azadirona e seus derivados, gedunina e seus derivados, compostos de tipo vilasinina e C-secomeliacinas como nimbina, salanina e azadiractina. Os não-isoprenóides incluem aminoácidos, polissacarídeos, compostos sulfurosos, polifenóis tais como flavonóides, dihidrochalconas, cumarinas, taninos, compostos alifáticos, dentre outros (Helmy *et al.*, 2007).

Várias partes da árvore de Nim são usadas na medicina Ayurvédica (Kumar e Navaratnam, 2013). A tradicionalidade destes usos vão desde efeitos analgésicos até anorexígenos conforme sumarizado na Tabela 2. Alzohairy (2016) cita três possíveis vias de atuação de componenetes do Nim como (i) papel antioxidante pelos compostos nimbolide, azadiractina e ascorbato; (ii) regulação das vias de sinalização celular, modulando genes supressores de tumores e (iii) papel antiinflamatório através da regulação das enzimas ciclo- e lipo-oxigenases (COX e LOX, respectivamente).

Tabela 1. Partes do Nim com efeitos medicinais

Partes da árvore de Nim	Indicações terapêuticas
Casca	Analgésico
Folhas	Problemas intestinais, anorexia, câncer
Flores	Supressão biliar
Frutos	Desordens urinárias, problemas oculares, diabetes
Óleo	Escabiose, doenças de pele

Adaptado de: Paul *et al.*, 2011.

O extrato aquoso das folhas de Nim demonstraram promover diminuição dos níveis glicêmicos em modelos de diabetes induzida por estreptozotocina possivelmente pela ação da quercetina, que atua regulando a sinalização e secreção insulínica (Kaur *et al.*, 2011). A administração por 8 semanas do extrato das folhas de Nim na dose de 500mg/kg em associação a espécie *Vernonia amygdalina* em ratos diabéticos promoveu uma atenuação do estresse oxidativo hepático e não promoveu alterações morfológicas (Akinola *et al.*, 2011).

Resultados indicam também que extrato das folhas do Nim são benéficos na proteção de peroxidação lipídica induzida por estresse oxidativo em humanos (Sithisarn *et al.*, 2005) e elevação dos níveis de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase em processos carcinogênicos (Manal *et al.*, 2007). Os efeitos antiinflamatórios e antioxidantes de extratos da folha se devem ao efeito sinérgico entre os constituintes desta espécie via inibição da COX e estimulação de citocinas pró-inflamatórias (Umar *et al.*, 2014).

Estudos mostram que o extrato das folhas na concentração de 200mg/Kg tem efeitos ansiolíticos em ratos (Singh *et al.*, 1980; Singh *et al.*, 1987). Em modelos de indução de DA, o extrato aquoso das folhas mostrou significativa atenuação de déficits cognitivos e diminuição do estresse oxidativo (Raghavendra *et al.*, 2013).

Estudos atribuem o papel neuroprotetor do Nim a polifenóis como a desoxigedunina que após um tratamento de duas semanas promoveu melhora comportamental e reduziu a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra em modelos da doença de Parkinson. Os mecanismos para tal incluem a ativação de receptores de TrkB e moléculas de sinalização como MAPK (Nie *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com o extrato hidroacoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (EHFN) sobre parâmetros metabólicos e neurocomportamentais de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose.

2.2 Objetivos Específicos

- ➔ Determinar a presença de polifenóis presentes no EHFN e sua atividade antioxidante;
- ➔ Avaliar o efeito do tratamento com o EHFN sobre os parâmetros metabólicos de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose;
- ➔ Investigar o efeito do tratamento com o EHFN sobre os parâmetros neurocomportamentais de ratos com síndrome metabólica induzida por dieta rica em sacarose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo do extrato hidroalcoólico das folhas de Nim, *Azadirachta indica* A. Juss

As folhas de Nim foram coletadas no campus da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) no município de São Luís, Maranhão, nas coordenadas geográficas 2°34'38.3"S 44°12'36.4"W no mês de janeiro de 2017. Amostras do material foram identificadas e catalogadas pelo herbário Rosa Mochel da UEMA sob número 1690. O material coletado foi dessecado (27 °C), pulverizado (32 mesh), macerado em etanol 70% sob constante agitação com 3 renovações do líquido extrator a cada 72h (1:3 p/v) e, posteriormente, concentrado e liofilizado para obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de Nim codificado como EHFN. Para os testes *in vivo* utilizamos uma dose de 300mg/Kg do EHFN, selecionada a partir de outros estudos que investigaram ações da espécie sobre o metabolismo e/ou cognição (Chattopadhyay, 2003; Gupta *et al.*, 2004; Shrivastava *et al.*, 2012; Raghavendra *et al.*, 2013; Satyanarayana *et al.*, 2015).

3.2 Avaliação de polifenóis totais e atividade antioxidante do EHFN

A quantificação de polifenóis totais foi avaliada pelo método ferrocianeto/azul de Prússia a partir de adaptações do método proposto por Da Silva *et al.* (2014). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores das absorbâncias das diferentes concentrações do extrato liofilizado foram inseridos na equação da reta obtida da curva analítica de ácido gálico. O teor de polifenóis foi expresso como equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de extrato. A absorbância utilizada para leitura foi de 750nm.

A capacidade antioxidante do EHFN foi avaliada através do ensaio com o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH •) a partir de adaptações do método proposto por Floegel *et al.* (2011). Preparou-se uma solução-estoque de 24 µg/mL de DPPH em metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições para obtenção das concentrações de 4, 8, 12, 16 e 20 µg/mL que foram submetidas a leitura para confecção da curva de calibração. Em seguida, utilizamos volumes fixos de solução de DPPH (1900 µL) e de solução contendo EHFN (100 µL) em diferentes concentrações (2,5, 5, 25, 50, 100, 125 e 250 µg/mL). A leitura foi realizada em 515

nm utilizando metanol como branco. O resultado foi expresso como IC₅₀ que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH.

3.3 Animais

Foram utilizados 28 ratos Wistar logo após o desmame (machos; 21 dias; 58,3 ± 1,7 g) oriundos do Biotério Central da UFMA e mantidos no Biotério Setorial da Pós-Graduação da UFMA em gaiolas de polietileno forradas com xilana (máximo de 3 animais/gaiola) em ambiente controlado (23 ± 2 °C; umidade 60%; ciclo claro/escuro de 12h) e com livre acesso à água e ração. Todos os protocolos experimentais realizados no presente trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMA sob o parecer 231115.007690/2016-10.

3.4 Dieta rica em sacarose

A dieta rica em sacarose foi manufaturada a partir da ração padrão (Nuvilab®, Nuvital) pulverizada e acrescida de leite condensado (Moça®, Nestle) e açúcar refinado nas proporções de 40% e 8,5%, respectivamente (Pinto *et al.*, 2016a). A mistura formada foi manipulada para formar *pellets* semelhantes à ração padrão e dessecada em estufa com circulação de ar (38 °C por 3 dias). A composição centesimal das rações se encontra descritas na Tabela 2.

Tabela: Composição centesimal da dieta padrão e da rica em sacarose

Composição centesimal	Dieta Padrão	Dieta rica em sacarose
Carboidratos	55,4%	65%
Sacarose	10%	25%
Proteínas	21%	12,3%
Lipídeos	5,2%	4,3%
Valor energético	352 Kcal/100g	348 Kcal/100g

3.5 Abordagem experimental

Durante todo o período de vida, os animais foram pesados semanalmente para avaliação da progressão ponderal (g) e consumo de ração (g/100g/dia). Para determinação da obesidade, mensalmente, foi calculado o índice de Lee, que

resulta do quociente da raiz cúbica do peso corporal (g), pelo comprimento naso-anal (cm) (Bernardis e Patterson, 1968). O cálculo deste índice foi iniciado aos 30 dias de vida dos animais e utilizado como parâmetro para distribuição dos mesmos em dois grupos experimentais: o primeiro grupo alimentado com a ração padrão denominado grupo controle (CTR; n = 14); e o segundo alimentado com a dieta rica em sacarose (DRS; n = 14) (Figura 1).

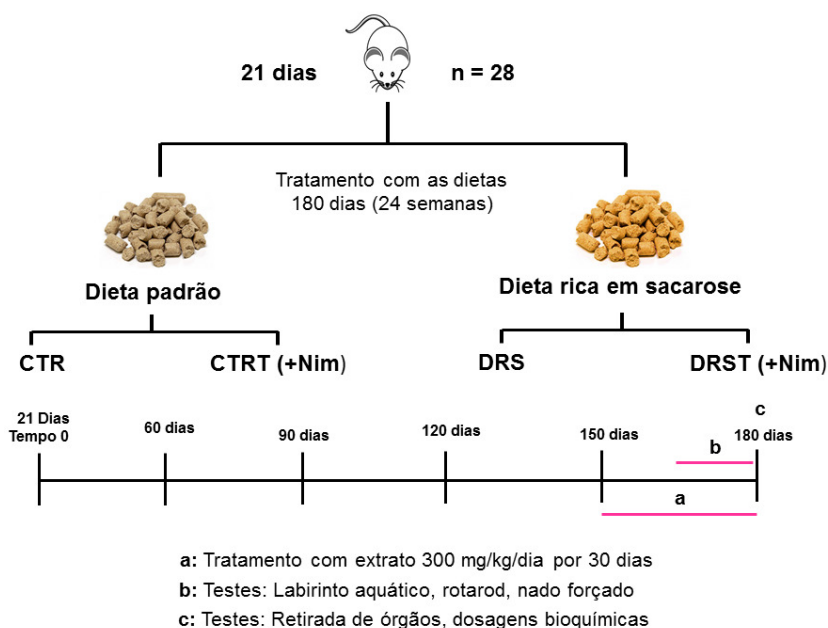


Figura 6. Delineamento experimental geral

Aos 150 dias de vida, os animais dos grupos CTR e DRS foram novamente divididos com base nos níveis de triglicerídeos em 4 grupos: grupo CTR (n = 7), composto por animais que continuaram recebendo dieta CTR e receberam veículo por via oral (água destilada; 0,1 ml/Kg) diariamente por 30 dias; grupo CTR tratado (CTRT; n = 7), composto por animais que além da dieta CTR, receberam EHFN (300mg/kg; v.o.) por 30 dias; grupo DRS (n = 7), composto por animais que continuaram recebendo dieta DRS e veículo (água destilada; v.o.) por 30 dias; e por fim, grupo DRS tratado (DRST; n = 7), composto por animais que continuaram recebendo dieta DRS e concomitante tratamento com EHFN (300mg/kg; v.o.).

Neste período os animais também foram submetidos a jejum para coleta de amostras de sangue periférico por seção da cauda para determinação dos níveis glicêmicos em glicosímetro (Accu-Chek Active®, Roche) e do perfil lipídico

(triglicerídeos e colesterol total) por métodos colorimétricos segundo os procedimentos descritos pelo fabricante dos kits (Labtest[®], Brasil). Para avaliação de resistência à insulina, foi calculado o índice TyG, expresso pela fórmula $\text{Ln}[(\text{Níveis de triglicerídeos em mg/dL}) \times (\text{glicemia em mg/dL})/2]$ (Guerrero-Romero *et al.*, 2010).

Na semana precedente à eutanásia, os grupos experimentais foram submetidos a protocolos comportamentais para avaliação de aprendizado e memória de curto prazo dependente do hipocampo pelo labirinto aquático de Morris; para avaliação da motricidade e equilíbrio pelo método do rotarod; para avaliação de comportamento de depressão pelo método do nado forçado.

Aos 180 dias de vida, os animais foram submetidos a jejum de 8h, anestesiados com solução de cetamina/xilazina (40:10 mg/kg), laparotomizados para coleta de órgãos e de sangue via artéria mesentérica. Alíquotas de sangue total foram utilizadas para determinação dos níveis glicêmicos em glicosímetros e o soro foi separado (3500 rpm; 10 min; 4 °C) para dosagem do perfil lipídico (colesterol total e triglicerídeos) por métodos colorimétricos segundo os procedimentos descritos pelo fabricante dos kits (Labtest[®], Brasil). Para avaliação morfológica, foram coletados os coxins adiposos (retroperitoneal, periepídimal e mesentérico) que foram normalizados em função da massa corporal total de cada animal (g do tecido/100g de peso do animal).

3.6 Avaliação cognitiva, motora e comportamental

3.6.1 Avaliação cognitiva

Para avaliação de funções cognitivas, realizamos o teste do labirinto aquático de Morris. Neste os animais foram individualmente inseridos em uma piscina circular (1,2 m de diâmetro; 50 cm de profundidade; contendo água a 22 °C) dividida em 4 quadrantes com figuras geométricas de referência fixadas em suas paredes e com presença, em um dos quadrantes, de uma plataforma de escape submersa (2,5 cm abaixo do nível da água). Inicialmente, foi avaliado a capacidade de aprendizado espacial dos animais por meio do tempo em segundos para localizar a plataforma após 4 sessões de 60 s cada, partindo dos pontos de referência. Ao localizar a plataforma, os animais permaneceram na mesma por 30 s e aqueles que

por ventura não conseguiram localizar a plataforma, foram guiados à mesma e mantidos pelo mesmo tempo. Cada animal realizou 4 sessões diárias de treino, durante 5 dias. No sexto dia, para determinação da capacidade de consolidação de memórias de curto prazo, a plataforma foi retirada e registrou-se o tempo que o animal permaneceu no quadrante que continha originalmente a plataforma após 60s de teste (Morris, 1984).

3.6.2 Avaliação motora

Para avaliação motora os animais foram submetidos ao teste do rotarod (Hamm *et al.*, 1994). Inicialmente, os animais foram submetidos a um teste de aptidão motora, que consiste na acomodação dos mesmos no rotarod que contém uma barra giratória horizontal de rotação ajustável (4 rpm; 1 min). Foram considerados aptos os animais que se equilibraram na barra por pelo menos 30 segundos. Os animais selecionados seguiram então para a etapa de treinamento onde foram acomodados sobre a barra giratória por 4 dias (10 rpm; 5 min; 3 tentativas). Ao quinto dia, os grupos experimentais foram avaliados em uma única sessão sob maior aceleração (15 rpm; 5 min). O resultado foi expresso pela média do tempo de permanência sobre a barra em segundos durante o período de treinamento e pelo tempo de permanência no último dia de teste.

3.6.3 Avaliação comportamental

Para avaliação de comportamento depressivo realizamos o teste do labirinto do nado forçado. O teste do nado forçado consiste na inserção individual dos ratos em um recipiente cilíndrico preenchido com água (paredes transparentes; 50 cm de altura x 2,5 cm de diâmetro; 30 cm de água a $25 \pm 1^\circ\text{C}$). A quantidade de água adicionada cria uma situação inescapável que impossibilita tanto a fuga superior quanto impede que o animal se apoie no fundo do cilindro. Após 5 minutos de observação foram registradas o tempo de latência para imobilidade e tempo total de imobilidade do animal no interior do cilindro (Porsolt *et al.*, 1978).

3.7 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., US). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n = 7 por grupo) e submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) seguido por análise paramétrica ANOVA unidirecional (pós teste Newman-Keuls) com uma significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 EHFN possui polifenóis e atividade antioxidante

O EHFN apresentou um teor de compostos fenólicos totais de $12 \pm 0,12$ mg de ác. Gálico/100 mg de extrato e atividade antioxidante nas diferentes concentrações do extrato avaliadas resultando em um IC_{50} de $141,3 \pm 6,40$ $\mu\text{g/mL}$.

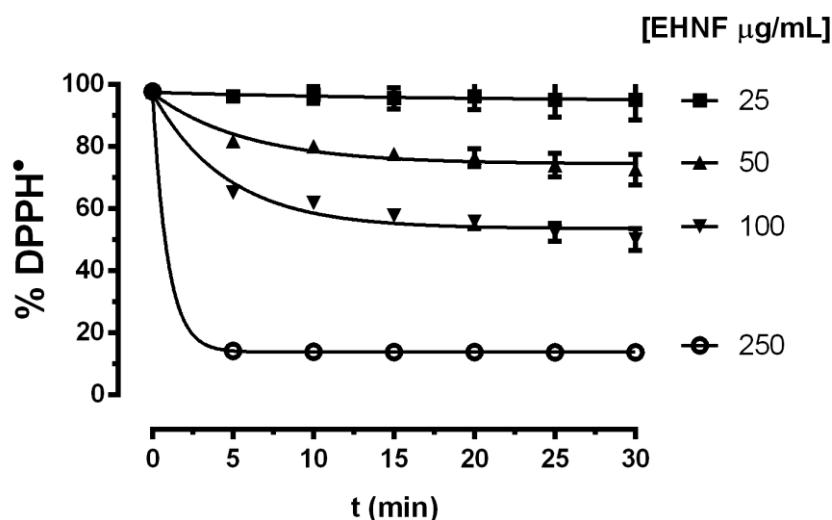


Figura 7. Curva de reação com o radical DPPH ($R^2 = 0,9978$)

4.2 EHFN atenua alterações metabólicas em animais com fenótipo obesogênico

Em nosso estudo, a exposição à dieta rica em sacarose por 24 semanas (grupo DRS) não foi capaz de induzir aumento de peso e desenvolvimento de obesidade quando comparados ao grupo CTR ($469,9 \pm 19,28$ vs $449,2 \pm 14,23$ g; $321,3 \pm 1,88$ vs. $315 \pm 2,41$ $\text{g}^{1/3} \times \text{cm}^{-1} \times 1000$). O tratamento com o EHFN também não se mostrou capaz de alterar as variáveis de peso corporal e índice de Lee tanto nos animais alimentados com ração padrão (CTRT; $443,2 \pm 10,2$ g; $320,2 \pm 2,92$ $\text{g}^{1/3} \times \text{cm}^{-1} \times 1000$) ou com a dieta rica em sacarose (DRST; $414,02 \pm 13,59$ g; $315,3 \pm 2,58$ $\text{g}^{1/3} \times \text{cm}^{-1} \times 1000$) (Figura 3A, 3C). Os animais DRS apresentaram um menor consumo alimentar quando comparados ao CTR ($4,2 \pm 0,10$ vs. $5,10 \pm 0,10$ g/100g/dia) e a administração de EHFN não levou a alterações destes padrões de consumo tanto nos grupos CTRT ($4,06 \pm 0,11$ g/100g/dia) e DRST ($4,07 \pm 0,13$ g/100g/dia) (Figura 3B).

Por outro lado, a dieta rica em sacarose foi eficaz em aumentar os depósitos adiposos brancos peripedidimal, mesentérico e retroperitoneal e o EHFN teve sucesso em reduzir estes acúmulos em aproximadamente 28,17% para o depósito periepididimal ($3,5 \pm 0,27$ vs. $2,51 \pm 0,36$ g/100g de peso corporal) (Figura 3D); 41,04% para a gordura mesentérica ($1,8 \pm 0,26$ vs. $1,06 \pm 0,09$ g/100g de peso corporal) (Figura 3E) e 31,89% para a retroperitoneal ($3,57 \pm 0,18$ vs. $2,43 \pm 0,29$ g/100g de peso corporal) (Figura 3F). De modo relevante apresentamos o sucesso do tratamento com EHFN em reduzir a massa de coxins adiposos viscerais não-viscerais em animais com acúmulo adiposo, sem no entanto, reduzir a massa adiposa e corpórea em animais normais (Figura 3A e 3D-F), demonstrando que o EHFN não possui características adipolíticas, e sim, anti-adipogênicas.

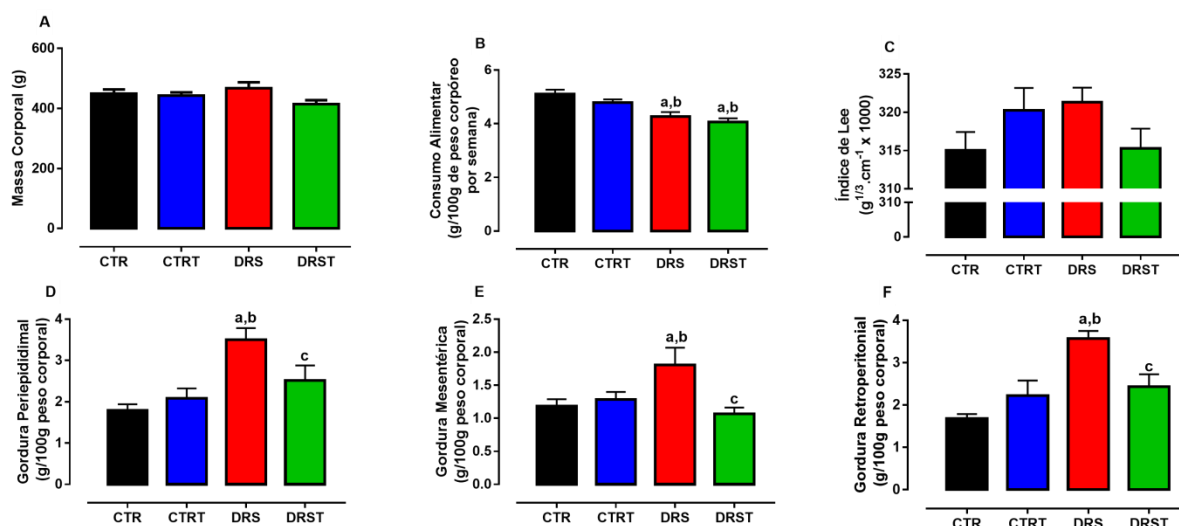


Figura 8. Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EHFN) sobre parâmetros morfométricos. Ratos alimentados com ração padrão ou rica em sacarose tratados ou não com EHFN (300mg/Kg/dia, v.o) por 30 dias. Valores depois do tratamento (aos 180 dias) para **A.** Massa corporal (g); **B.** Consumo Alimentar (g/100g de massa corporal); **C.** Índice de Lee [$\text{g}^{1/3}/\text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000$]; **D.** Gordura Periepididimal (g/100g peso corpóreo); **E.** Gordura Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo); **F.** Gordura Mesentérica (g/100g peso corpóreo). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n= 6 - 8 por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao **a.** CTR; **b.** CTRT; **c.** DRS analisados por análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls)

Os níveis glicêmicos (Figura 4A) e de colesterol total (Figura 4C) mantiveram-se sem alterações em todos os grupos de animais que receberam dieta CTR ou DRS tratados ou não com o EHFN. Entretanto, os animais que receberam DRS apresentaram hipertrigliceridemia em relação aos animais que não receberam esta dieta (CTR = $84,28 \pm 14,43$ vs. DRS = $155,4 \pm 18,68$ mg/dL). O tratamento com EHFN demonstrou uma tendência à redução dos níveis de triglicerídeos nos animais DRS ($130,8 \pm 14,02$ mg/dL) (Figura 4B). Por fim, exposição a DRS teve sucesso em estabelecer resistência à insulina avaliada pelo índice TyG ($8,82$ vs $8,22$), porém o EHFN não restabeleceu este quadro patológico ($8,85$) (Figura 3D).

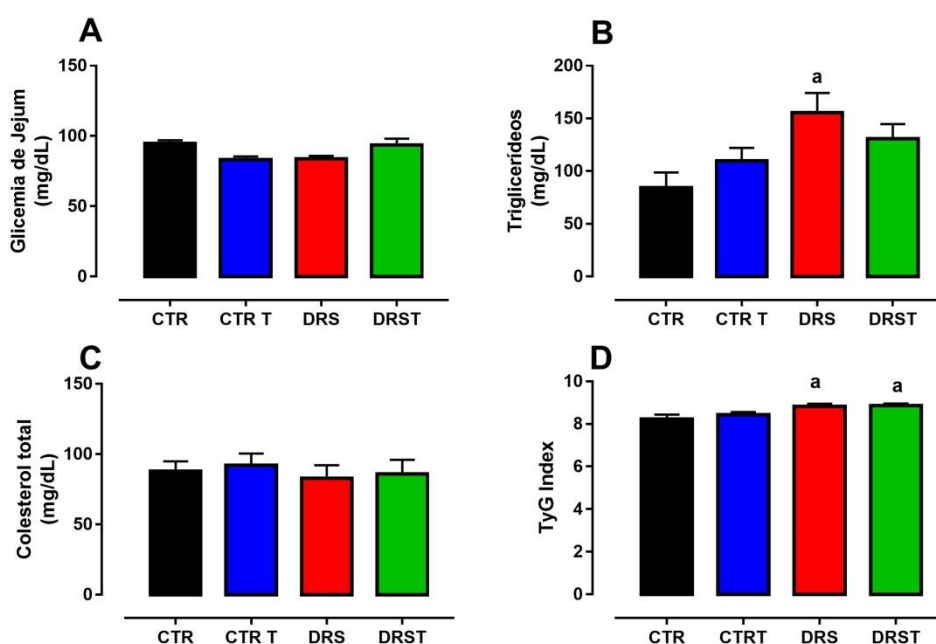


Figura 9. Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EHFN) sobre parâmetros bioquímicos. Os ratos alimentados com ração padrão ou rica em sacarose foram tratados ou não com EHFN (300mg/Kg/dia, v.o) por 30 dias. **A.** Glicemia (mg/dL); **B.** Triglicerídeos (mg/dL); **C.** Colesterol (mg/dL); **D.** Índice TyG. Os resultados são expressos como média $\pm$ e.p.m (n= 6 - 8 por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($<0,05$) em relação ao **a.** CTR analisados por ANOVA (One-way analysis of variance) seguido pelo pós-teste Newman-Keuls.

4.3 O tratamento com EHFN promove melhores curvas de aprendizado e previne danos neuromotores em animais com fenótipo obesogênico

No que concerne à avaliação cognitiva, exposição a dieta DRS acarretou em déficits de aprendizado espacial em todos os dias de acompanhamento no labirinto

aquático (ensaios com a plataforma visível) e o EHFN demonstrou melhorar esta capacidade de aquisição e evocação de aprendizado espacial de forma semelhante ao CTR (Figura 5A). A dieta DRS e o EHFN não demonstraram interferir o processo de consolidação de memórias de curto prazo relacionados ao hipocampo (Figura 5B).

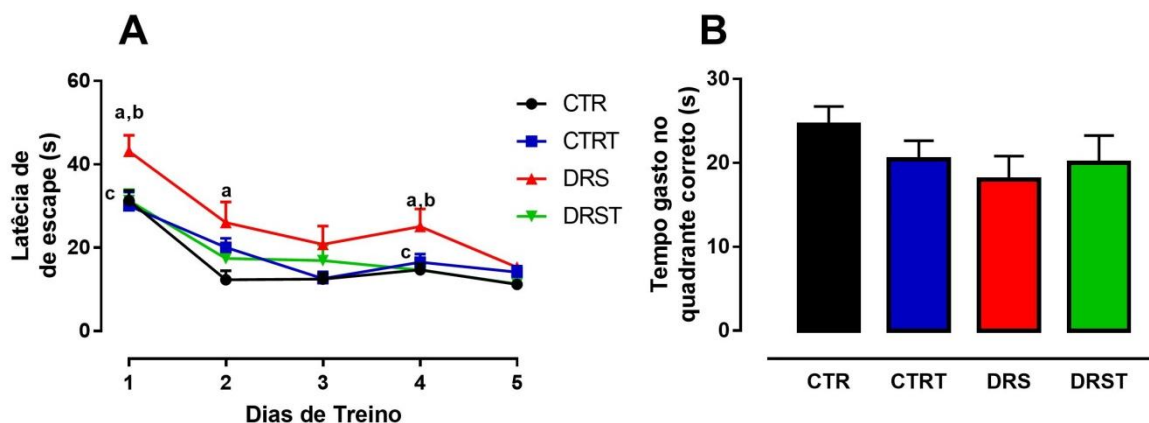


Figura 10. Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EHFN) sobre a cognição ao teste do Labirinto aquático de Morris. Ratos alimentados com ração padrão ou rica em sacarose tratados ou não com EHFN (300mg/Kg/dia, v.o) por 30 dias. Valores depois do tratamento (aos 180 dias) para **A.** Curva de aquisição de memória; Tempo de escape (s) **B.** Teste – tempo no quadrante correto (s) Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n= 6 - 8 por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao **a.** CTR; **b.** CTRT analisados por análise de variância (One-way ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls)

A avaliação de motricidade e equilíbrio demonstrou que os animais expostos a DRS No teste do rotarod (Figura 6) os resultados mostram que os animais DRS apresentaram comprometimento do aprendizado motor (Figura 6A) e de sua capacidade de locomoção em 74,69 % ($57,8 \pm 15,01$) quando comparados ao CTR ($228,3 \pm 36,58$) (Figura 6B). O tratamento com o EHFN restabeleceu o aprendizado motor (Figura 11A) e motricidade/equilíbrio dos animais expostos ao excesso de sacarose ($235,8 \pm 41,66$) (Figura 6B).

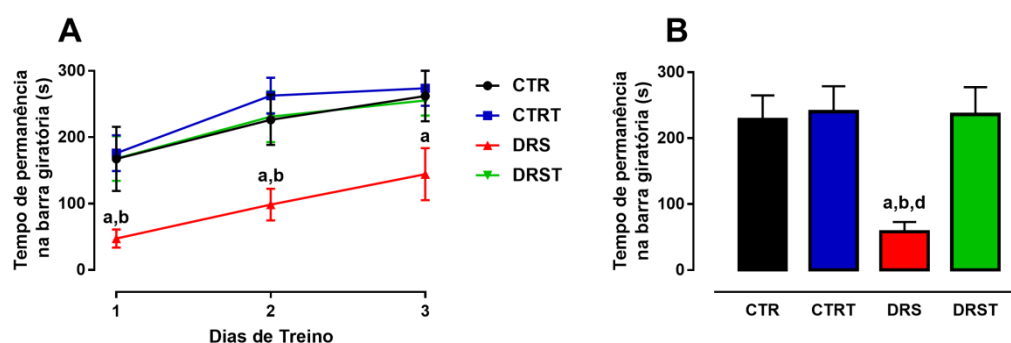


Figura 11. Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EHFN) sobre a função motora no teste de rotarod. Valores depois do tratamento (aos 180 dias) para **A.** Treinos - Tempo de permanência na barra giratória (s) **B.** Teste – Tempo de permanência na barra giratória (s). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n= 6 - 8 por grupo). As letras indicam uma diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao **a.** CTR; **b.** CTRT; **d.** drst analisados por kruskal- wallis, comparações múltiplas por dunn's.

A exposição à sacarose e o tratamento com o EHFN não levaram a alterações comportamentais de depressão nos parâmetros avaliados nos testes do nado forçado (Figura 7)

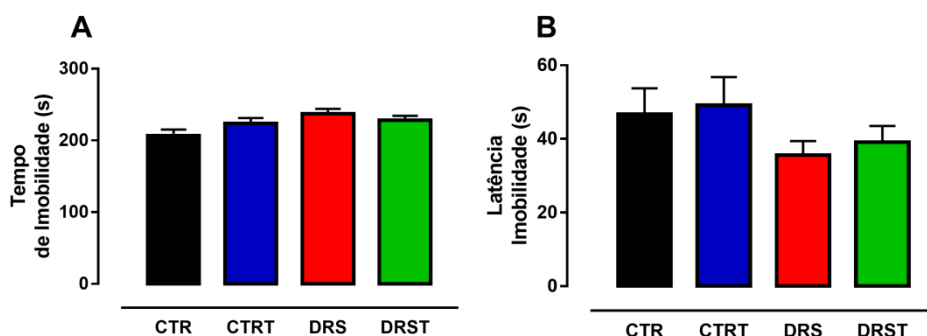


Figura 12. Efeitos do Extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* (EHFN) sobre o comportamento no teste de nado forçado. Valores depois do tratamento (aos 180 dias) para **A.** Tempo de imobilidade (s) **B.** Latência para imobilidade (s). Os resultados foram expressos como média $\pm$ e.p.m (n= 6 - 8 por grupo).

5. DISCUSSÃO

Os padrões de consumo da sociedade atual com dietas hipercalóricas e/ou com maior presença de carboidratos e lipídeos (Desroches e Lamarche, 2007; Kolovou *et al.*, 2007; Saklayen, 2018) contribui diretamente para o crescimento epidêmico de desordens associadas à SM, tais como a obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Alberti *et al.*, 2009). Estudos demonstram que além de efeitos sobre o metabolismo, o consumo excessivo de sacarose está relacionado a ações deletérias sobre o cérebro favorecendo o surgimento de declínio cognitivo e demência precoce (Stranahan *et al.*, 2008).

Neste âmbito, plantas com atividade antioxidante são alvos de várias pesquisas para o tratamento tanto de alterações metabólicas quanto neurocomportamentais, pois compostos como os polifenóis têm efeitos diretos sobre o sistema nervoso central ao atravessarem a barreira hematoencefálica e promoverem plasticidade sináptica em regiões importantes para a consolidação de

memórias (Marles e Farnsworth, 1995; Briskin, 2000; Tabassum e Ahmad, 2011; Wang *et al.*, 2013; Kooti *et al.*, 2016; Vauzour, 2017).

Em conjunto de nossos dados demonstram que o tratamento com EHFN promove atividade antiadipogênica, atenua a hipertrigliceridemia, promove otimização no processo de aquisição de memória bem como previne danos neuromotores induzidos pelo consumo de dieta rica em sacarose.

EHFN possui polifenóis e atividade antioxidante

Metabólitos secundários possuem inúmeras propriedades, dentre elas as de antioxidantes de ocorrência natural capazes de conter os efeitos nocivos de doenças relacionadas ao estresse oxidativo como as alterações da SM (Li *et al.*, 2008). O nim possui muitos compostos biologicamente ativos, incluindo alcalóides, flavonóides, triterpenóides, compostos fenólicos, carotenóides, esteroides, cetonas, triterpenóides e limonóides (Biswas *et al.*, 2002).

É reportado que os compostos polifenólicos são os principais reponsáveis pelas variações de atividade antioxidante entre as plantas (Cai *et al.*, 2004) e que extratos de várias partes da árvore de nim tem atividade de eliminação de radicais livres contra os radicais (DPPH) e (ABTS), especialmente os extratos de folhas, flores e cascas de caule (Kiranmai *et al.*, 2011) devido a sua significativa composição de fenóis e flavonóides como quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo, catequinas e resveratrol (Chattopadhyay, 2003; Sri *et al.*, 2012).

Em nível biológico isto é percebido em trabalhos onde o tratamento com extrato aquoso de folhas de *A. indica* em ratos diabéticos Charles Foster por 30 dias normalizou significativamente os níveis alterados de peroxidação lipídica e o status antioxidante (superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) (Shrivastava *et al.*, 2012). No presente estudo demonstramos que o EHFN possui significativo teor de fenóis e atividade antioxidante, dados estes que encontram-se em consonância à literatura onde foram realizadas detecções com diferentes solventes e partes da planta (Deka *et al.*, 2013; Bader *et al.*, 2015) .

O tratamento com EHFN atenua alterações metabólicas em animais com fenótipo obesogênico

No presente estudo demonstramos que o EHFN promove redução do acúmulo de gorduras viscerais e não-viscerais, bem como reduza os níveis de triglicerídeos em animais com um quadro de alterações metabólicas características da SM.

A grande maioria das pesquisas investigam os efeitos de extratos da espécie *A. indica* sobre o metabolismo em modelos de indução de diabetes por estreptozotocina em detrimento ao dietético. Em nossa pesquisa onde utilizamos a indução de alterações metabólicas e neurocomportamentais pelo consumo de dieta rica em sacarose, encontramos maior acúmulo de gorduras nos animais DRS que foi prevenido em todos os depósitos adiposos de animais pelo tratamento com o EHFN, indicando que este possua efeitos antiadipogênicos.

Especulações deste cunho devem-se ao fato de que este efeito ocorreu somente em um padrão animal com alterações metabólicas sem, no entanto, exercer qualquer atividade em animais em condições fisiológicas, ratos considerados normais. Chattopadhyay (2003) em sua discussão sobre possíveis mecanismos pelos quais o Nim tem efeitos antihiperlipemicos conferiu as atividades à compostos polifenólicos. Esta informação tem seu grau de relevância uma vez que os polifenóis reduzem o depósito de gorduras, especialmente as viscerais (Wolfram *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014).

Sobre o peso corporal e índice de Lee o tratamento com EHFN não teve ações, porém animais tratados com o extrato apresentaram menor consumo alimentar. Em partes, não termos observado efeito da administração do extrato sobre o peso e o índice de Lee, deve-se à ausência de elevação destas variáveis induzidas pela dieta nos animais DRS. Comparativamente à literatura, trabalhos como os de Satyanarayana *et al.* (2015) e Shrivastava *et al.* (2012) apesar de terem utilizado modelo de indução de diabetes em ratos com dieta HFD não relatam em seus achados as avaliações acerca do peso corporal e consumo alimentar dos animais. Jayakumar *et al.* (2002) verificaram que ratos tratados com extrato aquoso das folhas de Nim na dose de 500mg/Kg não possuem diferenças no peso e consumo alimentar em relação a ratos que receberam água. El-Hawary e Kholief

(1990) em modelo de indução farmacológica constataram que o tratamento com extrato das folhas de Nim na mesma dose que utilizamos (300mg/Kg) promove redução de peso corporal (17%) em animais diabéticos.

Sobre o consumo alimentar, a redução deu-se em ambos os grupos que ingeriram dieta rica em sacarose, quer tenham sido tratados ou não com extrato. Estudos demonstram que a ingestão de carboidratos está relacionada a um menor consumo alimentar ao promover desaceleramento do esvaziamento gástrico e da secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (Gutzwiller *et al.*, 1999; Flint *et al.*, 2001), secreção de leptina e inibição aguda de regiões hipotalâmicas associadas ao apetite (Tulloch *et al.*, 2015).

Em geral, a leptina inibe as vias estimuladoras do apetite e estimula as vias de supressão do apetite ao diminuir a ingestão de alimentos em parte modulando sinais orexígenos como o neuropeptídeo Y (NPY) e orexinas, e através da interação com peptídeos anoréxicos, incluindo colecistocinina (CCK), transcrição regulada por cocaína e anfetamina (CART) (Sahu, 2003; Klok *et al.*, 2007).

Apesar da ausência de elevação dos níveis de glicose e colesterol, os valores de triglicerídeos do grupo DRS foram significativamente diferentes em relação aos controles, o que é consistente com a literatura (Kanazawa *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2016a). Sabe-se que o consumo de dieta rica em sacarose promove efeitos deletérios no metabolismo dos carboidratos e lipídios antes mesmo do estabelecimento da síndrome metabólica (Burgeiro *et al.*, 2017).

Evidências indicam que a frutose é o principal nutriente mediador da hipertrigliceridemia, resistência à insulina e intolerância à glicose induzida pela sacarose (Thresher *et al.*, 2000). Tanto a glicose quanto a frutose entram na circulação portal sendo direcionadas ao fígado ou passam para a circulação geral, porém a frutose é a mais lipogênica e pode potencialmente modificar o equilíbrio de ácidos graxos em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e induzir efeitos secundários prejudiciais como hipertrigliceridemia ou resistência à insulina (Laville e Nazare, 2009). Os efeitos deste açúcar simples dão-se mediante ações sobre padrões de expressão gênica, principalmente aqueles envolvidos na lipogênese de novo (por exemplo, atividade da proteína de ligação a elementos reguladores de carboidratos (ChREBP) e SREBP-1 nuclear), fatores de saciedade no cérebro,

aumento da inflamação, espécies reativas de oxigênio, endotoxina via receptores Toll-like, e indução de resistência à leptina (Dekker *et al.*, 2010).

Significativos estudos conferem ao Nim atividades antihiperlipidêmicas, antihiperglicêmicas e atividade hipotensora (Chattopadhyay *et al.*, 1986; Chattopadhyay *et al.*, 1987; Chattopadhyay, 1995; Chattopadhyay, 2003). Extratos etanólicos das folhas de Nim também demonstraram em modelo diabético induzido por aloxana, redução dos níveis de triglicerídeos (Ekaidem *et al.*, 2007). Os mecanismos de ação pelos quais esta espécie atua sobre o metabolismo lipídico, ainda permanecem desconhecidos (Alshammari *et al.*, 2017).

De modo geral, sabe-se que flavonóides e polifenóis diminuem os lipídios intracelulares reduzindo assim o risco de hiperlipidemia e aterosclerose (Du *et al.*, 2015). Alshammari *et al.* (2017) demonstraram que o tratamento com Nim regula a homeostase lipídica em hepatócitos, inibe ROS, aumenta os níveis de enzimas antioxidantes e promove regulação direta da expressão de genes PPAR γ e LXR α , moduladores do colesterol.

Adicionalmente, nossos dados sugerem que o consumo de dieta com sacarose (25%) por um período prolongado (24 semanas) leva ao desenvolvimento de RI periférica, avaliado pelo TyG. RI é uma condição com níveis normais ou elevados de insulina produzindo efeitos biológicos atenuados, sendo um evento central na patofisiologia da diabetes (Chattopadhyay, 2003).

Neste panorama, em modelo animal diabético induzido por dieta rica em gordura ou frutose, onde os ratos foram tratados com extrato aquoso das folhas de nim (400mg/kg b.w. por 30 dias), constatou-se a restauração de parâmetros como a sinalização insulínica devido à expressão de GLUT4 bem como a utilização de glicose pelo músculo gastrocnêmico (Satyanarayana *et al.*, 2015). Perez-Gutierrez e Damian-Guzman (2012) conferem ao composto meliacinolina presente no Nim o potencial anti-diabético que exerce suas atividades hipolipemiantes e reguladoras da insulina por inibir a α -glucosidase e α -amilase pancreática.

Portanto, a resistência à insulina, hipertrigliceridemia, acúmulo de gordura visceral precedem e contribuem para o desenvolvimento do DM2 e, mesmo na ausência de hiperglicemia, ganhos de peso e maior índice de Lee, fazem parte do agrupamento de fatores de risco da SM. Neste quadro, o EHFN é capaz de atenuar

os níveis de triglicerídeos e reduzir o acúmulo de gorduras sem alterar marcadores de toxicidade hepática (dados não mostrados).

O tratamento com EHFN promove melhores curvas de aprendizado e previne danos neuromotores em animais com fenótipo obesogênico

A. indica é uma planta de significativo interesse devido à sua ampla, versátil e histórica utilização em diferentes partes da Ásia e África para o tratamento de um largo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos sobre o sistema nervoso central (Biswas *et al.*, 2002). Sobre esta última atividade verificamos na presente investigação que o tratamento com EHFN é capaz de promover expressiva proteção neuromotora bem como atenuação de ações nocivas na curva de aprendizagem em animais com alterações metabólicas característica da SM.

Para a avaliação cognitiva, realizamos o teste do Labirinto de Morris que avalia a aprendizagem dependente do hipocampo, incluindo a aquisição de memória espacial e memória espacial de longo prazo sendo, portanto, importante em estudos de neurobiologia e neurofarmacologia de aprendizagem espacial (Bromley-Brits *et al.*, 2011). Em nossos achados verificamos que o tratamento com EHFN minimizou significativamente atrasos nas latências de escape durante os treinos, porém ao teste, o tratamento por si só não revelou nenhum efeito sobre a consolidação da aprendizagem.

Resultados similares foram obtidos em tratamentos com o Nim (300 mg/kg/dia) em modelo animais com lesões no núcleo basal induzidas farmacologicamente (Raghavendra *et al.*, 2013) e em modelos animais com lesão de reperfusão cerebral e hipoperfusão cerebral em longo prazo (Yanpallewar *et al.*, 2005).

Com base em nosso modelo, pesquisadores sugerem que os prejuízos de processamento cognitivo após consumo de sacarose (Jurdak *et al.*, 2008; Jurdak e Kanarek, 2009) sejam decorrentes de diversos fatores, como: elevação dos níveis de triglicerídeos, hiperglicemia e hiperinsulinemia, que em conjunto instauram estresse oxidativo e interferem na sinalização da insulina, levando a RI em nível hipocampal e perda de plasticidade neuronal (Stranahan *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2015).

Em nível de avaliação motora realizamos o teste de rotarod utilizado para avaliar a coordenação motora de roedores sendo especialmente sensível na

detecção de disfunção cerebelar e uma eficiente ferramenta para triagem inicial de comprometimento neuromuscular (Mann e Chesselet, 2015). Nossos dados demonstram que o tratamento com o EHFN tem efeito protetor a nível motor.

Em outros trabalhos, a administração por 28 dias do extrato aquoso das folhas de Nim (200 e 400 mg/kg, p.o) em um modelo animal de neuropatia periférica reduziu o tempo de queda dos animais ao rotarod, isto é, promoveu melhor coordenação motora que segundo os autores é devido à efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e anti-apoptóticos (Kandhare *et al.*, 2017). Estudos mais recentes têm sugerido que o hipocampo além relacionado ao processamento cognitivo tem projeções neurais da porção ventral que fazem sinapses com o estriado ventral e a amígdala, demonstrando um papel importante deste na motricidade e comportamento (Strange *et al.*, 2014).

Déficits motores geralmente estão associados a aumento de peso corporal, atrofia muscular e degeneração neuromotora (Brooks e Dunnett, 2009). Tendo em vista que nos animais DRS as alterações de peso corpóreo e atrofia muscular não foram evidentes, sugerimos uma possível degeneração neuromotora, pois esta correto em áreas associativas relacionadas ao controle motor pode ser uma causa primária para os prejuízos de motricidade observados no modelo (Pinto *et al.*, 2016b).

Adicionalmente, para as avaliações comportamentais realizamos o teste do nado forçado que é comumente utilizado para avaliações de depressão/atividade antidepressiva (Porsolt *et al.*, 1978). Em nossos achados não foram constatados efeitos depressores tanto em animais com alterações metabólicas quanto em animais considerados normais. Raghavendra *et al.* (2013) encontraram ações antidepressivas após o tratamento com extrato, porém em modelo de Alzheimer induzido farmacologicamente.

Em suma, este estudo reforça que o consumo precoce de dieta rica em sacarose leva a alterações no metabolismo lipídico, promove maior deposição de gorduras viscerais e não-viscerais e induz a um quadro de resistência insulínica que culminam em déficits cognitivos e motores. Frente a este quadro, o tratamento com EHFN promove atividade antiadipogênica, atenua a hipertrigliceridemia, promove otimização no processo de aquisição de memória bem como proteção neuromotora em animais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo o conjunto de nossos dados demonstraram que o tratamento com EHFN promove atividade antiadipogênica, atenua a hipertrigliceridemia, promove otimização no processo de aquisição de memória bem como previne danos neuromotores induzidos pelo consumo de dieta rica em sacarose.

Constatou-se que o EHFN possui significativo teor de fenóis e atividade antioxidante, composição esta que possui inúmeros efeitos biológicos benéficos e está em consonância à literatura onde foram realizadas detecções em diferentes solvetes e partes da planta.

Verificamos nos animais que aos 180 dias estes apresentavam resistência à insulina, elevados níveis de triglicerídeos e acúmulo de gordura visceral que em conjunto são fatores que precedem e contribuem para o desenvolvimento do DM2 e, mesmo na ausência de hiperglicemia, ganhos de peso e maior índice de Lee, fazem parte do agrupamento de fatores de risco da SM. Neste quadro, o EHFN foi capaz de atenuar os níveis de triglicerídeos e reduzir o acúmulo de gorduras sem alterar marcadores de toxicidade hepática

Adicionalmente, este estudo reforça que o consumo precoce de dieta rica em sacarose além de levar a alterações no metabolismo lipídico, promover maior deposição de gorduras viscerais e não-viscerais e induzir a um quadro de resistência insulínica, promove também o surgimento de déficits cognitivos e motores. O EHFN tem efeitos benéficos no processo de aquisição de memória bem como tem expressiva proteção neuromotora em animais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados desta dissertação de mestrado corroboram achados anteriormente obtidos no laboratório de fisiologia da Universidade Federal do Maranhão demonstrando que os mecanismos envolvidos no surgimento da síndrome metabólica levam também ao desenvolvimento de comprometimentos cognitivos e expressivo dano neuromotor.

Nesta conjuntura demonstramos de forma inédita que o tratamento com a espécie vegetal *Azadirachta inidica* (Nim), amplamente distribuída no Estado do Maranhão, tem efeitos significativos por promover proteção em nível neuromotora, possivelmente pela contenção do estresse oxidativo

Este trabalho também contribuiu para a consolidação de campos de conhecimento e de capacidade técnica a partir da apresentação no 2º Workshop Internacional em Ciências da Saúde – UFMA (2018) bem como submissão de artigo de revisão que já se encontra em processo de resposta aos revisores intitulado “*Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer’s disease therapy*” na revista *Frontiers in Pharmacology* (Qualis A2 – Medicina 1; Fator de Impacto – 4.40).

Em perspectiva o segundo artigo oriundo dos resultados experimentais está em fase de produção além da execução de testes que contribuam para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais o tratamento com o extrato de Nim promoveu proteção neuromotora.

Por fim, este trabalho teve sucesso em fomentar o desenvolvimento de massa crítica que tornem mais célere as descobertas, a evolução e a divulgação do conhecimento gerado e contribuir de forma efetiva ao desenvolvimento científico e tecnológico do Estado do Maranhão.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, R.; GOMEZ-PINILLA, F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and cognition. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 10, p. 2485-2499, 2012. ISSN 1469-7793.

AHIMA, R. S. **Metabolic basis of obesity**. Springer Science & Business Media, 2010. ISBN 1441916075.

AKINOLA, O. B.; OMOTOSO, G. O.; AKINOLA, O. S.; DOSUMU, O. O.; ADEWOYE, E. T. Effects of combined leaf extract of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica* on hepatic morphology and hepatotoxicity markers in streptozotocin-induced diabetic rats. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 9, n. 12, p. 1373-9, 2011.

ALBERTI, G.; ZIMMET, P.; SHAW, J.; GRUNDY, S. M. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. **Brussels: International Diabetes Federation**, v. 23, n. 5, p. 469-80, 2006.

ALBERTI, K.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, K. A.; FRUCHART, J.-C.; JAMES, W. P. T.; LORIA, C. M.; SMITH, S. C. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the international diabetes federation task force on epidemiology and prevention; national heart, lung, and blood institute; American heart association; world heart federation; international atherosclerosis society; and international association for the study of obesity. **Circulation**, v. 120, n. 16, p. 1640-1645, 2009. ISSN 0009-7322.

ALSHAMMARI, G. M.; BALAKRISHNAN, A.; CHINNASAMY, T. Nimbolide attenuate the lipid accumulation, oxidative stress and antioxidant in primary hepatocytes. **Molecular biology reports**, v. 44, n. 6, p. 463-474, 2017. ISSN 0301-4851.

ALZOHAIY, M. A. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. **Evidence-Based complementary and alternative medicine**, v. 2016, 2016. ISSN 1741-427X.

ANGELOPOULOS, T. J.; LOWNDES, J.; ZUKLEY, L.; MELANSON, K. J.; NGUYEN, V.; HUFFMAN, A.; RIPPE, J. M. The effect of high-fructose corn syrup consumption on triglycerides and uric acid. **The Journal of nutrition**, v. 139, n. 6, p. 1242S-1245S, 2009. ISSN 0022-3166.

BADER, A.; ABDELHADY, M. I.; SHAHEEN, U.; EL-MALAH, Y.; ABOUREHAB, M.; BARGHASH, M. F. *Azadirachta indica* as a source for antioxidant and cytotoxic

polyphenolic compounds. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. 2, p. 1209-1222, 2015.

BAUR, J. A.; PEARSON, K. J.; PRICE, N. L.; JAMIESON, H. A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V. V.; ALLARD, J. S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337, 2006. ISSN 1476-4687.

BEILHARZ, J. E.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. **Brain, behavior, and immunity**, v. 37, p. 134-141, 2014. ISSN 0889-1591.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968. ISSN 0022-0795.

BIESSELS, G. J.; REAGAN, L. P. Hippocampal insulin resistance and cognitive dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 660, 2015. ISSN 1471-0048.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **CURRENT SCIENCE-BANGALORE**, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002. ISSN 0011-3891.

BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. **The American journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 4, p. 537-543, 2004. ISSN 0002-9165.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant physiology**, v. 124, n. 2, p. 507-514, 2000. ISSN 0032-0889.

BROMLEY-BRITS, K.; DENG, Y.; SONG, W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 53, 2011.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519-529, 2009. ISSN 1471-003X.

BUCKMAN, L. B.; HASTY, A. H.; FLAHERTY, D. K.; BUCKMAN, C. T.; THOMPSON, M. M.; MATLOCK, B. K.; WELLER, K.; ELLACOTT, K. L. Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. **Brain, behavior, and immunity**, v. 35, p. 33-42, 2014. ISSN 0889-1591.

BURGEIRO, A.; CERQUEIRA, M. G.; VARELA-RODRÍGUEZ, B. M.; NUNES, S.; NETO, P.; PEREIRA, F. C.; REIS, F.; CARVALHO, E. Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 638, 2017.

CAI, H.; CONG, W.-N.; JI, S.; ROTHMAN, S.; MAUDSLEY, S.; MARTIN, B. Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. **Current Alzheimer Research**, v. 9, n. 1, p. 5-17, 2012. ISSN 1567-2050.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004. ISSN 0024-3205.

CALVO-OCHOA, E.; HERNÁNDEZ-ORTEGA, K.; FERRERA, P.; MORIMOTO, S.; ARIAS, C. Short-term high-fat-and-fructose feeding produces insulin signaling alterations accompanied by neurite and synaptic reduction and astroglial activation in the rat hippocampus. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 34, n. 6, p. 1001-1008, 2014. ISSN 0271-678X.

CAMANDOLA, S.; MATTSON, M. P. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. **The EMBO journal**, v. 36, n. 11, p. 1474-1492, 2017. ISSN 0261-4189.

CARVALHO, C.; CARDOSO, S.; CORREIA, S. C.; SANTOS, R. X.; SANTOS, M. S.; BALDEIRAS, I.; OLIVEIRA, C. R.; MOREIRA, P. I. Metabolic alterations induced by sucrose intake and Alzheimer's disease promote similar brain mitochondrial abnormalities. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 1234-1242, 2012. ISSN 0012-1797.

CEFALU, W. T.; BRAY, G. A.; HOME, P. D.; GARVEY, W. T.; KLEIN, S.; PI-SUNYER, F. X.; HU, F. B.; RAZ, I.; VAN GAAL, L.; WOLFE, B. M. **Advances in the science, treatment, and prevention of the disease of obesity: reflections from a diabetes care editors' expert forum**: Am Diabetes Assoc 2015.

CHATTOPADHYAY, R. Hypolipidemic activity of Azadirachta indica leaf extract in rats. **PROCEEDINGS-INDIAN NATIONAL SCIENCE ACADEMY PART B**, v. 61, p. 281-281, 1995. ISSN 0073-6600.

CHATTOPADHYAY, R.; CHATTOPADHYAY, R.; NANDY, A.; PODDAR, G.; MAITRA, S. Antiserotonin activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem). **Bulletin Calcutta School of Tropical Medicine**, v. 34, p. 9-12, 1986.

CHATTOPADHYAY, R.; CHATTOPADHYAY, R.; NANDY, A.; PODDER, G.; MAITRA, S. Antiinflammatory activity of a fraction of fresh leaves of *Azadirachta indica* (Beng. Neem). **Bull. Calcutta Trop. Med**, v. 35, p. 6-8, 1987.

CHATTOPADHYAY, R. R. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: Part II. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 217-219, 2003. ISSN 0378-8741.

CHERNIACK, E. P. Polyphenols: planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. **Nutrition**, v. 27, n. 6, p. 617-623, 2011. ISSN 0899-9007.

CORKEY, B. E. Diabetes: Have We Got It All Wrong?: Insulin hypersecretion and food additives: cause of obesity and diabetes? **Diabetes Care**, v. 35, n. 12, p. 2432-2437, 2012. ISSN 0149-5992.

DA SILVA, L. M. R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T.; RICARDO, N. M. P. S.; VIEIRA, I. G. P.; DE FIGUEIREDO, R. W.; BRASIL, I. M.; GOMES, C. L. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food chemistry**, v. 143, p. 398-404, 2014. ISSN 0308-8146.

DEENEY, J. T.; GROMADA, J.; HØY, M.; OLSEN, H. L.; RHODES, C. J.; PRENTKI, M.; BERGGREN, P.-O.; CORKEY, B. E. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI β -cells). **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9363-9368, 2000. ISSN 0021-9258.

DEKA, H.; DAS, S.; LAHAN, J.; YADAV, R. In-vitro free radical scavenging, antioxidant and antibacterial activity of *Azadirachta indica* A. Juss. Of Assam. **Advances in Life Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-4, 2013. ISSN 2163-1395.

DEKKER, M. J.; SU, Q.; BAKER, C.; RUTLEDGE, A. C.; ADELI, K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 299, n. 5, p. E685-E694, 2010. ISSN 0193-1849.

DESPRÉS, J.-P.; LEMIEUX, I.; BERGERON, J.; PIBAROT, P.; MATHIEU, P.; LAROSE, E.; RODÉS-CABAU, J.; BERTRAND, O. F.; POIRIER, P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, v. 28, n. 6, p. 1039-1049, 2008. ISSN 1079-5642.

DESROCHES, S.; LAMARCHE, B. The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 32, n. 1, p. 23-32, 2007. ISSN 1715-5312.

DU, C.; SHI, Y.; REN, Y.; WU, H.; YAO, F.; WEI, J.; WU, M.; HOU, Y.; DUAN, H. Anthocyanins inhibit high-glucose-induced cholesterol accumulation and inflammation by activating LXR α pathway in HK-2 cells. **Drug design, development and therapy**, v. 9, p. 5099, 2015.

EKAIDEM, I. S.; AKPAN, H. D.; USOH, I. F.; ETIM, O. E.; EBONG, P. E. Effects of ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves on lipid peroxidation and serum lipids of diabetic Wistar rats. **Acta Biol Szegedensis**, v. 51, p. 17-20, 2007.

EL-HAWARY, Z.; KHOLIEF, T. Biochemical studies on hypoglycemic agents (I) effect of *Azadirachta indica* leaf extract. **Archives of Pharmacal Research**, v. 13, n. 1, p. 108-112, 1990. ISSN 0253-6269.

FARR, S. A.; YAMADA, K. A.; BUTTERFIELD, D. A.; ABDUL, H. M.; XU, L.; MILLER, N. E.; BANKS, W. A.; MORLEY, J. E. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2628-2636, 2008. ISSN 0013-7227.

FLINT, A.; RABEN, A.; ERSBØLL, A.; HOLST, J.; ASTRUP, A. The effect of physiological levels of glucagon-like peptide-1 on appetite, gastric emptying, energy and substrate metabolism in obesity. **International journal of obesity**, v. 25, n. 6, p. 781, 2001. ISSN 1476-5497.

FLOEGEL, A.; KIM, D.-O.; CHUNG, S.-J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of food composition and analysis**, v. 24, n. 7, p. 1043-1048, 2011. ISSN 0889-1575.

GIRISH, K.; BHAT, S. Neem Á a green treasure. **Electronic journal of Biology**, v. 4, n. 3, 2008. ISSN 1860-3122.

GOLD, S.; DZIOBEK, I.; SWEAT, V.; TIRSI, A.; ROGERS, K.; BRUEHL, H.; TSUI, W.; RICHARDSON, S.; JAVIER, E.; CONVIT, A. Hippocampal damage and memory impairments as possible early brain complications of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 4, p. 711-719, 2007. ISSN 0012-186X.

GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G. Glucose treatment reduces memory deficits in young adult rats fed high-fat diets. **Neurobiology of learning and memory**, v. 75, n. 2, p. 179-189, 2001. ISSN 1074-7427.

_____. High-fat diets, insulin resistance and declining cognitive function. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 1, p. 42-45, 2005. ISSN 0197-4580.

GROSS, D.; VAN DEN HEUVEL, A.; BIRNBAUM, M. The role of FoxO in the regulation of metabolism. **Oncogene**, v. 27, n. 16, p. 2320, 2008. ISSN 1476-5594.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE, P. J.; SMITH, S. C. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17, p. 2735-2752, 2005. ISSN 0009-7322.

GUERRERO-ROMERO, F.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; GONZÁLEZ-ORTIZ, M.; MARTÍNEZ-ABUNDIS, E.; RAMOS-ZAVALA, M. A. G.; HERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, S. O.; JACQUES-CAMARENA, O.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3347-3351, 2010. ISSN 0021-972X.

GUILHERME, A.; VIRBASISUS, J. V.; PURI, V.; CZECH, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 367, 2008. ISSN 1471-0080.

GUPTA, S.; KATARIA, M.; GUPTA, P.; MURGANANDAN, S.; YASHROY, R. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 90, n. 2-3, p. 185-189, 2004. ISSN 0378-8741.

GUPTA, S. C.; PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Neem (*Azadirachta indica*): An indian traditional panacea with modern molecular basis. **Phytomedicine**, v. 34, p. 14-20, 2017. ISSN 0944-7113.

GUTZWILLER, J.; GÖKE, B.; DREWE, J.; HILDEBRAND, P.; KETTERER, S.; HANDSCHIN, D.; WINTERHALDER, R.; CONEN, D.; BEGLINGER, C. Glucagon-like peptide-1: a potent regulator of food intake in humans. **Gut**, v. 44, n. 1, p. 81-86, 1999. ISSN 0017-5749.

HAMM, R. J.; PIKE, B. R.; O'DELL, D. M.; LYETH, B. G.; JENKINS, L. W. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. **Journal of neurotrauma**, v. 11, n. 2, p. 187-196, 1994. ISSN 0897-7151.

HASSELMO, M. E. The role of acetylcholine in learning and memory. **Current opinion in neurobiology**, v. 16, n. 6, p. 710-715, 2006. ISSN 0959-4388.

HELMY, W. A.; AMER, H.; EL-SHAYEB, N. M. Biological and anti-microbial activities of aqueous extracts from neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae). **J Appl Sci Res**, v. 3, n. 10, p. 1050-1055, 2007.

HEYMSFIELD, S. B.; WADDEN, T. A. Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 3, p. 254-266, 2017. ISSN 0028-4793.

HOSTETTMANN, K.; BORLOZ, A.; URBAIN, A.; MARSTON, A. Natural product inhibitors of acetylcholinesterase. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 825-847, 2006. ISSN 1385-2728.

HOUGHTON, P. J.; AGBEDAHUNSI, J. M.; ADEGBULUGBE, A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2893-2896, 2004. ISSN 0031-9422.

HOWES, M. J. R.; PERRY, N. S.; HOUGHTON, P. J. Plants with traditional uses and activities, relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 1, p. 1-18, 2003. ISSN 1099-1573.

HSU, T. M.; KONANUR, V. R.; TAING, L.; USUI, R.; KAYSER, B. D.; GORAN, M. I.; KANOSKI, S. E. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. **Hippocampus**, v. 25, n. 2, p. 227-239, 2015. ISSN 1098-1063.

HUANG, T.-T.; LEU, D.; ZOU, Y. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 576, p. 2-7, 2015. ISSN 0003-9861.

IWANGOFF, P.; ARMBRUSTER, R.; ENZ, A.; MEIER-RUGE, W. Glycolytic enzymes from human autaptic brain cortex: normal aged and demented cases. **Mechanisms of ageing and development**, v. 14, n. 1-2, p. 203-209, 1980. ISSN 0047-6374.

JAYAKUMAR, K.; SRINIVASAN, M.; RAMESH, N.; SACHAN, A.; UMESH, M.; NARAYANA, K. Effect of neem leaf extract on feed intake and body weight in rats. **Indian Veterinary Journal (India)**, 2002. ISSN 0019-6479.

JOHNSON, R. J.; SEGAL, M. S.; SAUTIN, Y.; NAKAGAWA, T.; FEIG, D. I.; KANG, D.-H.; GERSCH, M. S.; BENNER, S.; SÁNCHEZ-LOZADA, L. G. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 86, n. 4, p. 899-906, 2007. ISSN 0002-9165.

JURDAK, N.; KANAREK, R. B. Sucrose-induced obesity impairs novel object recognition learning in young rats. **Physiology & behavior**, v. 96, n. 1, p. 1-5, 2009. ISSN 0031-9384.

JURDAK, N.; LICHTENSTEIN, A. H.; KANAREK, R. B. Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. **Nutritional neuroscience**, v. 11, n. 2, p. 48-54, 2008. ISSN 1028-415X.

KANAZAWA, M.; XUE, C. Y.; KAGEYAMA, H.; SUZUKI, E.; ITO, R.; NAMBA, Y.; OSAKA, T.; KIMURA, S.; INOUE, S. Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. **Nutrition reviews**, v. 61, n. s5, 2003. ISSN 1753-4887.

KANDHARE, A. D.; MUKHERJEE, A. A.; BODHANKAR, S. L. Neuroprotective effect of Azadirachta indica standardized extract in partial sciatic nerve injury in rats: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic studies. **EXCLI journal**, v. 16, p. 546, 2017.

KAPLAN, R. J.; GREENWOOD, C. E.; WINOCUR, G.; WOLEVER, T. M. Cognitive performance is associated with glucose regulation in healthy elderly persons and can be enhanced with glucose and dietary carbohydrates—. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 3, p. 825-836, 2000. ISSN 0002-9165.

KAUR, L.; HAN, K.-S.; BAINS, K.; SINGH, H. Indian culinary plants enhance glucose-induced insulin secretion and glucose consumption in INS-1 β -cells and 3T3-L1 adipocytes. **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1120-1125, 2011. ISSN 0308-8146.

KIRANMAI, M.; KUMAR, M.; IBRAHIM, M. Free radical scavenging activity of neem tree (Azadirachta indica a. Juss var., Meliaceae) root bark extract. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 4, p. 134-136, 2011.

KIVIPELTO, M.; NGANDU, T.; LAATIKAINEN, T.; WINBLAD, B.; SOININEN, H.; TUOMILEHTO, J. Risk score for the prediction of dementia risk in 20 years among

middle aged people: a longitudinal, population-based study. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 9, p. 735-741, 2006. ISSN 1474-4422.

KLEIN, J. P.; WAXMAN, S. G. The brain in diabetes: molecular changes in neurons and their implications for end-organ damage. **The Lancet Neurology**, v. 2, n. 9, p. 548-554, 2003. ISSN 1474-4422.

KLOK, M.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. **Obesity reviews**, v. 8, n. 1, p. 21-34, 2007. ISSN 1467-789X.

KOLOVOU, G. D.; ANAGNOSTOPOULOU, K. K.; SALPEA, K. D.; MIKHAILIDIS, D. P. The prevalence of metabolic syndrome in various populations. **The American journal of the medical sciences**, v. 333, n. 6, p. 362-371, 2007. ISSN 0002-9629.

KONRATH, E. L.; ORTEGA, M. G.; DE LORETO BORDIGNON, S.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; CABRERA, J. L. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 28, n. 1, p. 218-222, 2013. ISSN 1475-6366.

KOOTI, W.; FAROKHIPOUR, M.; ASADZADEH, Z.; ASHTARY-LARKY, D.; ASADI-SAMANI, M. The role of medicinal plants in the treatment of diabetes: a systematic review. **Electronic physician**, v. 8, n. 1, p. 1832, 2016.

KOTANI, K.; TOKUNAGA, K.; FUJIOKA, S.; KOBATAKE, T.; KENO, Y.; YOSHIDA, S.; SHIMOMURA, I.; TARUI, S.; MATSUZAWA, Y. Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 18, n. 4, p. 207-202, 1994.

KUMAR, V. S.; NAVARATNAM, V. Neem (*Azadirachta indica*): prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 7, p. 505-514, 2013. ISSN 2221-1691.

KYLIN, E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglyka" mie-Hyperurika" miesyndrom. **Zentralblatt für innere Medizin**, v. 44, p. 105-127, 1923.

LACKEY, D. E.; OLEFSKY, J. M. Regulation of metabolism by the innate immune system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 15, 2016. ISSN 1759-5037.

LAKHAN, S. E.; KIRCHGESSNER, A. The emerging role of dietary fructose in obesity and cognitive decline. **Nutrition journal**, v. 12, n. 1, p. 114, 2013. ISSN 1475-2891.

LAVILLE, M.; NAZARE, J. A. Diabetes, insulin resistance and sugars. **Obesity reviews**, v. 10, n. s1, p. 24-33, 2009. ISSN 1467-789X.

LI, H.-B.; WONG, C.-C.; CHENG, K.-W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 385-390, 2008. ISSN 0023-6438.

LINDQVIST, A.; MOHAPEL, P.; BOUTER, B.; FRIELINGS DORF, H.; PIZZO, D.; BRUNDIN, P.; ERLANSON-ALBERTSSON, C. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **European journal of neurology**, v. 13, n. 12, p. 1385-1388, 2006. ISSN 1468-1331.

LUCHSINGER, J. A.; TANG, M.-X.; SHEA, S.; MAYEUX, R. Caloric intake and the risk of Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 8, p. 1258-1263, 2002. ISSN 0003-9942.

MANAL, M.; HANACHI, P.; PATIMAH, I.; SIDDIG, I.; FAUZIAH, O. The effect of neem (*Azadirachta indica*) leaves extract on alpha-fetoprotein serum concentration, glutathione s-transferase and glutathione peroxidase activity in hepatocarcinogenesis induced rats. **Int Cancer Res**, v. 3, n. 2, p. 111-118, 2007.

MANDREKAR-COLUCCI, S.; KARLO, J. C.; LANDRETH, G. E. Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 30, p. 10117-10128, 2012. ISSN 0270-6474.

MANIAM, J.; ANTONIADIS, C. P.; YOUNGSON, N. A.; SINHA, J. K.; MORRIS, M. J. Sugar consumption produces effects similar to early life stress exposure on hippocampal markers of neurogenesis and stress response. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 8, p. 86, 2016. ISSN 1662-5099.

MANN, A.; CHESSELET, M.-F. Techniques for Motor Assessment in Rodents. In: (Ed.). **Movement Disorders (Second Edition)**: Elsevier, 2015. p.139-157.

MARCO, L.; CARREIRAS, M. D. C. Galanthamine, a natural product for the treatment of Alzheimer's disease. **Recent patents on CNS drug discovery**, v. 1, n. 1, p. 105-111, 2006. ISSN 1574-8898.

MARLES, R. J.; FARNSWORTH, N. R. Antidiabetic plants and their active constituents. **Phytomedicine**, v. 2, n. 2, p. 137-189, 1995. ISSN 0944-7113.

MELLO-FILHO, A. C.; MENEHINI, R. Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 251, n. 1, p. 109-113, 1991. ISSN 0027-5107.

MOLTENI, R.; BARNARD, R.; YING, Z.; ROBERTS, C.; GOMEZ-PINILLA, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. **Neuroscience**, v. 112, n. 4, p. 803-814, 2002. ISSN 0306-4522.

MOLTENI, R.; WU, A.; VAYNMAN, S.; YING, Z.; BARNARD, R.; GOMEZ-PINILLA, F. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 429-440, 2004. ISSN 0306-4522.

MORGAN, D.; GORDON, M. N.; TAN, J.; WILCOCK, D.; ROJIANI, A. M. Dynamic complexity of the microglial activation response in transgenic models of amyloid deposition: implications for Alzheimer therapeutics. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 64, n. 9, p. 743-753, 2005. ISSN 1554-6578.

MORRIS, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of neuroscience methods**, v. 11, n. 1, p. 47-60, 1984. ISSN 0165-0270.

MOSCONI, L. Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: methodological and physiological considerations for PET studies. **Clinical and translational imaging**, v. 1, n. 4, p. 217-233, 2013. ISSN 2281-5872.

NIE, S.; XU, Y.; CHEN, G.; MA, K.; HAN, C.; GUO, Z.; ZHANG, Z.; YE, K.; CAO, X. Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 448-458, 2015. ISSN 0028-3908.

OWUOR, E. D.; KONG, A.-N. T. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. **Biochemical pharmacology**, v. 64, n. 5-6, p. 765-770, 2002. ISSN 0006-2952.

PAGLIASSOTTI, M. J.; KANG, J.; THRESHER, J. S.; SUNG, C. K.; BIZEAU, M. E. Elevated basal PI 3-kinase activity and reduced insulin signaling in sucrose-induced

hepatic insulin resistance. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 282, n. 1, p. E170-E176, 2002. ISSN 1522-1555.

PAGLIASSOTTI, M. J.; PRACH, P. A.; KOPPENHAFFER, T. A.; PAN, D. A. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 5, p. R1319-R1326, 1996. ISSN 0363-6119.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; DAMIAN-GUZMAN, M. Meliacinolin: a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor isolated from *Azadirachta indica* leaves and in vivo antidiabetic property in streptozotocin-nicotinamide-induced type 2 diabetes in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 9, p. 1516-1524, 2012. ISSN 0918-6158.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J.; ZALDÍVAR-MACHORRO, V. J.; VILLANUEVA-PORRAS, D.; VEGA-ÁVILA, E.; CHAVARRÍA, A. A potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016. ISSN 1942-0900.

PERLUIGI, M.; DI DOMENICO, F.; BUTTERFIELD, D. A. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. **Neurobiology of disease**, v. 84, p. 39-49, 2015. ISSN 0969-9961.

PINTO, B. A. S.; MELO, T. M.; FLISTER, K. F. T.; FRANÇA, L. M.; KAJIHARA, D.; TANAKA, L. Y.; LAURINDO, F. R. M.; DE ANDRADE PAES, A. M. Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. **Metabolic brain disease**, v. 31, n. 4, p. 917-927, 2016a. ISSN 0885-7490.

_____. Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. **Metabolic brain disease**, p. 1-11, 2016b. ISSN 0885-7490.

PORIES, W. J.; DOHM, G. L. Diabetes: have we got it all wrong?: hyperinsulinism as the culprit: Surgery provides the evidence. **Diabetes care**, v. 35, n. 12, p. 2438-2442, 2012. ISSN 0149-5992.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European journal of pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978. ISSN 0014-2999.

PURI, H. S. **Neem: the divine tree *Azadirachta indica***. CRC Press, 2003. ISBN 0203304314.

RAGHAVENDRA, M.; MAITI, R.; KUMAR, S.; ACHARYA, S. Role of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves in an experimental model of Alzheimer's disease in rats. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 3, n. 1, p. 37, 2013.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001. ISSN 0041-0101.

REAVEN, G. M. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 25, p. 391-406, 2005a. ISSN 0199-9885.

_____. Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. **Cell metabolism**, v. 1, n. 1, p. 9-14, 2005b. ISSN 1550-4131.

RIVERA, L.; MORÓN, R.; SÁNCHEZ, M.; ZARZUELO, A.; GALISTEO, M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. **Obesity**, v. 16, n. 9, p. 2081-2087, 2008. ISSN 1930-739X.

SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 24, n. 4, p. 225-253, 2003. ISSN 0091-3022.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current hypertension reports**, v. 20, n. 2, p. 12, 2018. ISSN 1522-6417.

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. **The Journal of clinical investigation**, v. 126, n. 1, p. 12-22, 2016. ISSN 0021-9738.

SATYANARAYANA, K.; SRAVANTHI, K.; SHAKER, I. A.; PONNULAKSHMI, R. Molecular approach to identify antidiabetic potential of *Azadirachta indica*. **Journal of Ayurveda and integrative medicine**, v. 6, n. 3, p. 165, 2015.

SHRIVASTAVA, A.; CHATURVEDI, U.; SONKAR, R.; KHANNA, A. K.; SAXENA, J.; BHATIA, G. Antioxidant effect of *Azadirachta indica* on high fat diet induced diabetic Charles foster rats. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 2, p. 229-236, 2012. ISSN 0273-2289.

SINGH, P.; JUNNARKAR, A.; REDDI, G.; SINGH, K. *Azadirachta indica*: neuro-psycho pharmacological and antimicrobial studies. **Fitoterapia**, v. 58, p. 235-238, 1987.

SINGH, P.; JUNNARKAR, A.; THOMAS, G.; TRIPATHI, R.; VARMA, R. Antidepressant activity of *Azadirachta indica*. **Fitoterapia**, v. 61, p. 164-168, 1980.

SRI, U.; IBRAHIM, M.; KUMAR, M. Antioxidant activity and total flavonoids content of different parts of *Azadirachta indica* A. Juss. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 46, p. 5737-5742, 2012. ISSN 1996-0875.

STANHOPE, K. L.; SCHWARZ, J. M.; KEIM, N. L.; GRIFFEN, S. C.; BREMER, A. A.; GRAHAM, J. L.; HATCHER, B.; COX, C. L.; DYACHENKO, A.; ZHANG, W. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 5, p. 1322-1334, 2009. ISSN 0021-9738.

STEIN, D. T.; ESSER, V.; STEVENSON, B. E.; LANE, K. E.; WHITESIDE, J. H.; DANIELS, M. B.; CHEN, S.; MCGARRY, J. D. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 12, p. 2728-2735, 1996. ISSN 0021-9738.

STENEBERG, P.; SYKARAS, A. G.; BACKLUND, F.; STRASEVICIENE, J.; SÖDERSTRÖM, I.; EDLUND, H. Hyperinsulinemia enhances hepatic expression of the fatty acid transporter Cd36 and provokes hepatosteatosis and hepatic insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 31, p. 19034-19043, 2015. ISSN 0021-9258.

STERN, M. P.; WILLIAMS, K.; GONZÁLEZ-VILLALPANDO, C.; HUNT, K. J.; HAFFNER, S. M. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? **Diabetes care**, v. 27, n. 11, p. 2676-2681, 2004. ISSN 0149-5992.

STRANAHAN, A. M.; NORMAN, E. D.; LEE, K.; CUTLER, R. G.; TELLJOHANN, R. S.; EGAN, J. M.; MATTSON, M. P. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. **Hippocampus**, v. 18, n. 11, p. 1085-1088, 2008. ISSN 1098-1063.

STRANGE, B. A.; WITTER, M. P.; LEIN, E. S.; MOSER, E. I. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 10, p. 655-669, 2014. ISSN 1471-003X.

SUZANNE, M. Insulin resistance and Alzheimer's disease. **BMB reports**, v. 42, n. 8, p. 475, 2009.

SZKUDELSKA, K.; NOGOWSKI, L.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, a naturally occurring diphenolic compound, affects lipogenesis, lipolysis and the antilipolytic action of insulin in isolated rat adipocytes. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 113, n. 1-2, p. 17-24, 2009. ISSN 0960-0760.

TABASSUM, N.; AHMAD, F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 30, 2011.

TAPPY, L. Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. Suppl 1, p. jeb164202, 2018. ISSN 0022-0949.

TAPPY, L.; LÊ, K.-A. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. **Physiological reviews**, v. 90, n. 1, p. 23-46, 2010. ISSN 0031-9333.

THRESHER, J. S.; PODOLIN, D. A.; WEI, Y.; MAZZEO, R. S.; PAGLIASSOTTI, M. J. Comparison of the effects of sucrose and fructose on insulin action and glucose tolerance. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1334-R1340, 2000. ISSN 1522-1490.

TITCHENELL, P. M.; LAZAR, M. A.; BIRNBAUM, M. J. Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 7, p. 497-505, 2017. ISSN 1043-2760.

TOIDA, S.; TAKAHASHI, M.; SHIMIZU, H.; SATO, N.; SHIMOMURA, Y.; KOBAYASHI, I. Effect of high sucrose feeding on fat accumulation in the male Wistar rat. **Obesity**, v. 4, n. 6, p. 561-568, 1996. ISSN 1550-8528.

TRAN, T. T.; YAMAMOTO, Y.; GESTA, S.; KAHN, C. R. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. **Cell metabolism**, v. 7, n. 5, p. 410-420, 2008. ISSN 1550-4131.

TULLOCH, A. J.; MURRAY, S.; VAICEKONYTE, R.; AVENA, N. M. Neural responses to macronutrients: hedonic and homeostatic mechanisms. **Gastroenterology**, v. 148, n. 6, p. 1205-1218, 2015. ISSN 0016-5085.

TUNG, B. T.; HAI, N. T.; THU, D. K. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 24-32, 2017. ISSN 0378-8741.

UMAR, M. I.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A.; ABDUL MAJID, A.; ATANGWHO, I. J.; KHADEER AHAMED, M. B.; ALTAF, R.; AHMAD, A. Multi-constituent synergism is responsible for anti-inflammatory effect of *Azadirachta indica* leaf extract. **Pharmaceutical biology**, v. 52, n. 11, p. 1411-1422, 2014. ISSN 1388-0209.

VAUZOUR, D. Polyphenols and brain health. **OCL**, v. 24, n. 2, p. A202, 2017. ISSN 2272-6977.

WANG, J.; TANG, C.; FERRUZZI, M. G.; GONG, B.; SONG, B. J.; JANLE, E. M.; CHEN, T. Y.; COOPER, B.; VARGHESE, M.; CHENG, A. Role of standardized grape polyphenol preparation as a novel treatment to improve synaptic plasticity through attenuation of features of metabolic syndrome in a mouse model. **Molecular nutrition & food research**, v. 57, n. 12, p. 2091-2102, 2013. ISSN 1613-4133.

WANG, S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHEN, L.; MO, H.; SHASTRI, A.; SU, R.; BAPAT, P.; KWUN, I.; SHEN, C.-L. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2014. ISSN 0955-2863.

WINKLER, E. A.; NISHIDA, Y.; SAGARE, A. P.; REGE, S. V.; BELL, R. D.; PERLMUTTER, D.; SENGILLO, J. D.; HILLMAN, S.; KONG, P.; NELSON, A. R. GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 521, 2015. ISSN 1546-1726.

WOLFRAM, S.; RAEDERSTORFF, D.; WANG, Y.; TEIXEIRA, S. R.; ELSTE, V.; WEBER, P. TEAVIGOTM (epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 49, n. 1, p. 54-63, 2005. ISSN 0250-6807.

YANPALLEWAR, S.; RAI, S.; KUMAR, M.; CHAUHAN, S.; ACHARYA, S. Neuroprotective effect of *Azadirachta indica* on cerebral post-ischemic reperfusion and hypoperfusion in rats. **Life sciences**, v. 76, n. 12, p. 1325-1338, 2005. ISSN 0024-3205.

YE, X.; GAO, X.; SCOTT, T.; TUCKER, K. L. Habitual sugar intake and cognitive function among middle-aged and older Puerto Ricans without diabetes. **British journal of nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1423-1432, 2011. ISSN 1475-2662.

YOKOZAWA, T.; NAKAGAWA, T.; KITANI, K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 12, p. 3549-3552, 2002. ISSN 0021-8561.

ZHANG, Y.-J.; GAN, R.-Y.; LI, S.; ZHOU, Y.; LI, A.-N.; XU, D.-P.; LI, H.-B.
Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases.
Molecules, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015.

ZHAO, Q.; TANG, X. C. Effects of huperzine A on acetylcholinesterase isoforms in vitro: comparison with tacrine, donepezil, rivastigmine and physostigmine. **European journal of pharmacology**, v. 455, n. 2-3, p. 101-107, 2002. ISSN 0014-2999.

ZHOU, J.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates apoptosis and mitochondria-dependent caspase-3 in rat cortical neurons. **FEBS letters**, v. 526, n. 1-3, p. 21-25, 2002. ISSN 1873-3468.