

Gabrielle da Luz Moneretto

ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Salácia impressifolia*, *Croton heterodoxus* E TRITERPENOS NA HOMEOSTASIA DA GLICOSE EM MODELOS EXPERIMENTAIS *IN VIVO* E *IN VITRO*

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Bioquímica
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Mena Barreto Silva

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moneretto, Gabrielle da Luz

Estudo da atividade biológica de Salácia impressifolia, Croton heterodoxus e triterpenos na homeostasia da glicose em modelos experimentais in vivo e in vitro / Gabrielle da Luz Moneretto ; orientador, Fátima Regina Mena Barreto Silva - Florianópolis, SC, 2016.

146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

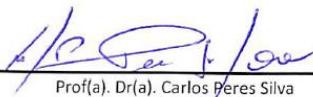
1. Bioquímica. 2. Diabetes. 3. Insulina. 4. GLP-1. 5. Triterpenos. I. Mena Barreto Silva, Fátima Regina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Bioquímica. III. Título.

"Estudo da atividade biológica de *Salácia Impressifolia*, *Croton Heterodoxus* e triterpenos na homeostasia da glicose em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*"

Por

Gabrielle da Luz Moneretto

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (04/PPGBQA/2016) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

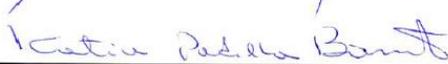
Banca examinadora:



Dr(a) Fátima Regina Mena Barreto Silva (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



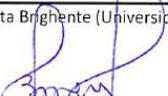
Dr(a) Leila Zanatta (Universidade do Estado de Santa Catarina - videoconferência)



Dr(a) Katia Padilha Barreto (Universidade Federal de Santa Maria)



Dr(a) Inês Maria da Costa Brighente (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Beatriz Garcia Mendes Borba (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 04 de março de 2016.

Dedico ao Thiago Moneretto,
com quem divido os méritos desta
conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus por suas magníficas manifestações em minha vida.

A minha orientadora, Professora Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva, pelo entusiasmo com que ensina a pesquisa e por sua orientação competente.

Aos amigos do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais e do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular, da Professora Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza, que me acompanharam nesta jornada, sempre dispostos a colaborar.

Ao professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti e alunos Leandro Espíndola e Ana Paula Ruani do Laboratório de Química de Produtos Naturais pela disponibilização dos compostos testados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Sinto-me orgulhosa por ter mestres com tamanha competência e dedicação pela pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos Biológicos e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica.

À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, que com sua excelência, proporcionou a construção de mais uma etapa de minha formação.

Às professoras componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À minha família, esse campo da vida, que é puro dom; é meu ouro, meu céu, minha paz, minha vida, meu lar.

Aos meus queridos pais, a gratidão eterna por semear sonhos e educar com amor e paciência.

Ao Thiago, querido companheiro, por me ensinar o que é mais importante na vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito de extratos e frações das plantas *Salacia impressifolia* e *Croton heterodoxus*, bem como um novo triterpeno derivativo, o fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol, na homeostase da glicose usando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Plantas e triterpenos foram avaliados quanto às atividades anti-hiperglicêmica e/ou hipoglicemiante na curva de tolerância à glicose, em modelo experimental de hiperglicemia induzida por sobrecarga de glicose (4g/kg), assim como efeito na secreção de insulina, na atividade das enzimas α -glicosidases *in vivo* e na propriedade anti-glicação *in vitro*. Além disso, foi estudado a translocação de vesículas contendo insulina no pâncreas e o mecanismo de ação do triterpeno derivativo na captação de glicose e influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas e intestino (côlon), e também a secreção *in vivo* do peptídeo semelhante ao glucagon 1 e a atividade da enzima dipeptidilpeptidase IV *in vitro*. Para experimentos *in vivo*, foram utilizados ratos machos Wistar com 50-55 dias de idade. Para determinação da glicemia e concentração do peptídeo semelhante ao glucagon 1, amostras de sangue foram coletadas nos tempos zero, 15, 30, 60 e 180 min na curva de tolerância à glicose; para insulina sérica, nos tempos zero, 15, 30 e 60. A captação de glicose e influxo de cálcio foram estudados depois da incubação das ilhotas pancreáticas e cólon intestinal com triterpeno derivativo, na presença ou não de diferentes inibidores/ativadores e de ^{14}C -glicose ou de cálcio ($^{45}\text{Ca}^{2+}$). A translocação de vesículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão. O extrato bruto, fração clorofórmio e resíduo insolúvel da *Salacia impressifolia* mostraram potencial atividade anti-hiperglicêmica em ratos hiperglicêmicos, reduziram a atividade da maltase e sacarase e demonstraram efeito anti-glicação. O extrato bruto da *Croton heterodoxus* e derivativo demonstraram potencial atividade anti-hiperglicêmica. Os resultados mostram que o triterpeno derivativo reduziu a glicose sanguínea em comparação com o triterpeno isolado; e reduziu a atividade da maltase. Além disso, o triterpeno derivativo estimulou a translocação das vesículas de insulina no pâncreas e aumentou a captação de glicose e o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas e cólon intestinal. Adicionalmente, o triterpeno derivativo estimulou a secreção de insulina e do peptídeo semelhante ao glucagon 1. Neste sentido, estas descobertas destacam a *Salacia impressifolia* e o triterpeno derivativo como um potencial candidato para utilização em terapias para a diabetes melito.

Palavras-chave: diabetes, hiperglicemia; *Salacia impressifolia*; *Croton heterodoxus*; triterpeno; insulina; AGEs; dissacaridasas; captação de glicose; influxo de cálcio; ilhotas pancreáticas; cólon intestinal.

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the effect of extracts and fractions of *Salacia impressifolia* and *Croton heterodoxus*, as well as the triterpene derivative, in glucose homeostasis using *in vivo* and *in vitro* experimental models. The anti-hyperglycemic activity in the glucose tolerance curve, the inhibition of the enzymes α -glucosidases and the anti-glycation property were investigated. In addition, it was also studied the mechanism of action of triterpene derivative in glucose and calcium uptake in pancreatic islet and intestinal colon, and also the *in vivo* glucagon-like peptide-1 secretion and *in vitro* dipeptidyl peptidase-IV activity. Vesicles translocation was available by transmission electronic microscopy. For the *in vivo* experiments, Wistar male rats at 50-55 day-old were used. To glycaemia and serum glucagon-like peptide-1 determination blood samples were collected at zero, 15, 30, 60 and 180 min at the glucose tolerance curve; to insulin, 0, 15, 30 and 60 min. The activity of intestinal disaccharidases was also evaluated *in vivo*. The involvement of dipeptidyl peptidase-IV and the anti-glycation property were evaluated *in vitro*. The glucose and calcium uptake was studied after incubation of the pancreatic islet and intestinal colon with triterpene and of ^{14}C -glucose or calcium ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) in the presence or not of different inhibitors. The pancreatic islets were isolated and incubated with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ and triterpene in the presence or absence of various inhibitors or activators. The crude extracts, chloroform and insoluble residue of *Salacia impressifolia* showed potential anti-hyperglycemic activity in hyperglycemic rats, reduced the activity of maltase and sucrose and prevented glycation. The crude extracts of *Croton heterodoxus* and triterpene derivative demonstrated potential anti-hyperglycemic activity. The results show that the triterpene derivative powered the serum glucose lowering compared with triterpene isolated; and reduced the activity of maltase. Also, triterpene stimulated insulin vesicles translocation in pancreas; and glucose and calcium uptake in isolated pancreatic islet and colon. Additionally, triterpene derivative stimulated glucagon-like peptide-1 and insulin secretion *in vivo*. In this sense, these findings highlight *Salacia impressifolia* and triterpene derivative as a potential candidate for use in therapies for diabetes.

Key-words: Diabetes, hyperglycemia; *Salacia impressifolia*; *Croton heterodoxus*; triterpene; insulin; AGEs; disaccharidases; glucose; calcium; pancreatic islet; colon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da insulina	27
Figura 2 - Representação esquemática da célula β pancreática e mecanismo de secreção de insulina.....	30
Figura 3- Mecanismo de ação das incretinas...	33
Figura 4 - <i>Salacia impressifolia</i> (A) e <i>Croton heterodoxus</i> (B)...	40
Figura 5 – Estruturas triterpênicas isoladas da <i>S. impressifolia</i> ...	41
Figura 6- Exemplos de terpenóides e as respectivas classes (A) Estrutura química do esqualeno (B).....	43
Figura 7 - Reação de modificação estrutural.....	50
Figura 8 - Tratamento <i>in vivo</i> de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 1)(n=8).....	52
Figura 9 - Tratamento <i>in vivo</i> de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 2) (n=8).....	53
Figura 10 - Tratamento <i>in vivo</i> de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 3) (n=8).....	54
Figura 11 - Fluxograma dos tratamentos <i>in vitro</i> para determinação da atividade anti-glicação da <i>S. impressifolia</i>	60
Figura 12– Comparação do efeito agudo do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl ₃ O na glicemia na curva de tolerância a glicose	65
Figura 13- Atividade específica das enzimas sacarase e maltase no duodeno de ratos.....	66
Figura 14 - Efeito agudo de RI e Fr-CHCl ₃ O na concentração de insulina (ng/mL) na curva de tolerância a glicose.....	67
Figura 15- Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl ₃ O na formação de fluorescência por AGEs no modelo ABS/glicose...	69
Figura 16- Efeito do EB, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl ₃ O na formação de fluorescência por AGEs no modelo ABS/frutose..	70
Figura 17 - Efeito e mecanismo de ação proposto para a planta <i>Salacia impressifolia</i>	74
Figura 18- Curva de concentração-resposta de T2 no estímulo da captação ¹⁴ C-DG nas ilhotas pancreáticas de ratos.....	78
Figura 19 - Curva tempo-dependente (A) e concentração-resposta (B) de T2 no influxo de ⁴⁵ Ca ²⁺ nas ilhotas pancreáticas.....	80
Figura 20 - Envolvimento de canais de K ⁺ _{ATP} no efeito	

estimulatório de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	81
Figura 21– Envolvimento de canais de $\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$ no efeito estimulatório de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	82
Figura 22 - Envolvimento do CCDV-L e do estoque de Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	84
Figura 23 - Envolvimento das vias da PKA e PKC no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	85
Figura 24– Microscopia eletrônica de transmissão. Efeito de T2 na translocação de vesículas de insulina nas ilhotas pancreáticas.....	86
Figura 25 - Efeito de T1 e T2 na atividade de LDH.....	87
Figura 26 - Resumo do efeito <i>in vitro</i> do triterpeno derivativo (T2) na via de secreção da insulina no pâncreas de ratos euglicêmicos.....	91
Figura 27- Efeito de T2 e sitagliptina na curva de tolerância à glicose.....	94
Figura 28- Efeito do T2 na concentração sérica de GLP-1.....	95
Figura 29 - Efeito de T2 na atividade da DPP-IV <i>in vitro</i>	96
Figura 30- Curva concentração-resposta (A) e tempo-dependente (B) de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal...	98
Figura 31- Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de T2 na captação de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal...	99
Figura 32- Envolvimento dos CCDV-L e do Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal..	100
Figura 33- Envolvimento das vias da PKA e PKC no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal.....	101
Figura 34- Atividade específica da enzima maltase no duodeno de ratos	102
Figura 35 – Efeito e mecanismo de ação proposto para o Triterpeno 2	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito agudo do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl ₃ O na glicemia (mg/dL) na curva de tolerância à glicose.....	64
Tabela 2- Efeito agudo do EB-CH na concentração de glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose.....	76
Tabela 3 - Efeito de T1 e T2 na curva de tolerância à glicose.....	76
Tabela 4- Efeito agudo de T2 na concentração de insulina (ng/mL) na curva de tolerância a glicose.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{14}C -DG	[U- ^{14}C]-2-desoxi-D-glicose
ABS	Albumina bovina sérica
ADP	Adenosina difosfato
AGEs	Produtos finais de glicação avançada, do inglês, Advanced Glycation End-products
Akt	Proteína cinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BAPTA-AM	Ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético (acetoximetil ester)
CCDV	Canal de Ca^{2+} dependentes de voltagem
CEUA	Comissão de ética do uso de animais
<i>C. heterodoxus</i>	<i>Croton heterodoxus</i>
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes melito
DM1	Diabetes melito tipo 1
DM2	Diabetes melito tipo 2
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPP-IV	Dipeptidilpeptidase IV
EB-CH	Extrato bruto da <i>C. heterodoxus</i>
EB-SI	Extrato bruto da <i>S. impressifolia</i>
ELISA	Ensaio imunoenzimático, do inglês, <i>enzyme linked Immuno sorbent assay</i>
FPP	Farnesildifosfato
Fr-AcOEt	Fração acetato de etila
Fr- CHCl_3O	Fração clorofórmio
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon-1
GLUT	Transportador de glicose
GPP	Geranildifosfato
H-89	N - [2 - (p- bromocianamilamino) etil] - 5 - isoquinolinesulfonamida
IP3	Inositol trifosfato
IPP	Isopentenil difosfato pirofosfato
IR	Receptor de insulina
K^+ _{ATP}	Canal de potássio dependentes de ATP
Kir 6.x	Canais de K^+ com retificação interna, do inglês

	<i>inward rectifying potassium 6.x</i>
KRb	Solução de Krebs Ringer
KRb-HEPES	Solução de Krebs Ringer adicionado de HEPES
K _v	Canais de potássio dependentes de voltagem
K ⁺ -Ca	Canais de potássio sensíveis a cálcio
LDH	Lactato Desidrogenase
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
RI	Resíduo insolúvel
<i>S. impressifolia</i>	<i>Salacia impressifolia</i>
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SGLT	Transportador de glicose dependente de sódio
SRI	Substratos do receptor de insulina
ST	Cloreto de esteroilcarnitina, do inglês <i>stearoylcarnitina</i>
SUR	receptores de sulfonilureia, do inglês <i>sulfonylurea receptor</i>
T1	Triterpeno 1
T2	Triterpeno 2
TRP	Canais de <i>potencial transiente</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão

SUMÁRIO

1.1 DIABETES MELITO (DM): EPIDEMIOLOGIA, CAUSAS, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS	23
1.2 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES, [DO INGLÊS, ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS]) ASSOCIADOS ÀS COMPLICAÇÕES DA DM.....	24
1.3. INSULINA	25
1.3.1 Histórico: a descoberta da insulina.....	26
1.3.2 Biossíntese de insulina no pâncreas	26
1.3.3 Secreção de insulina	27
1.3.4 Mecanismo de secreção de insulina nas células β pancreáticas	28
1.3.5 Mecanismo de ação da insulina.....	30
1.4 ABSORÇÃO DE GLICOSE NO INTESTINO	31
1.5 EIXO ÊNTERO-INSULAR.....	32
1.5.1 Regulação da secreção de GLP-1 no intestino	34
1.6 REGULAÇÕES DA HOMEOSTASIA DA GLICOSE.....	35
1.7 TERAPIA DA DM.....	37
1.7.1 Tratamento medicamentoso	37
1.7.2 Plantas medicinais	39
1.7.3 <i>Salacia impressifolia</i> (Miers) C. Smith (<i>S. impressifolia</i>).....	39
1.7.4 <i>Croton heterodoxus</i> (<i>C. heterodoxus</i>)	41
1.7.5 Terpenos.....	42
2. OBJETIVOS	45
2.1 OBJETIVO GERAL	45
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
3. METODOLOGIA	47
3.1 MATERIAIS	47
3.2 PLANTAS: FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS	48
3.2.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto de <i>S. impressifolia</i>	48
3.2.2 Preparação de extratos e frações de <i>C. heterodoxus</i>	48
3.2.3 Isolamento do fern-9(11)-ene-2α,3β-diol	49
3.2.4 Síntese do triterpeno derivativo (T2)	51
3.3 ANIMAIS.....	51
3.4 CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	55
3.5 INSULINA SÉRICA.....	55
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES INTESTINAIS <i>IN VIVO</i>	55
3.7 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLP-1 E DPP-IV <i>IN VITRO</i>	56
3.8 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS	56

3.9 CAPTAÇÃO DE GLICOSE (^{14}C -DG) NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS	57
3.10 INFLUXO DE $^{45}\text{Ca}^{2+}$ NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS E CÓLON INTESTINAL DE RATOS	57
3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	58
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-GLICAÇÃO DE <i>S. IMPRESSIFOLIA IN VITRO</i>	59
3.13 LACTATO DESIDROGENASE (LDH) SÉRICA	59
3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 PARTE 1: POTENCIAL AÇÃO ANTI-HIPERGLICÊMICA/HIPOGLICEMIANTE DO EB-SI E FRAÇÕES DO CAULE DA <i>S. IMPRESSIFOLIA</i>	63
4.1.1 Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr- CHCl_3O na curva de tolerância à glicose.....	63
4.1.2 Efeito do EB-SI, RI e Fr- CHCl_3O nas dissacaridasas.....	66
4.1.3 Efeito do RI e Fr- CHCl_3O na concentração de insulina sérica	67
4.1.4 Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr- CHCl_3O na glicação de albumina <i>in vitro</i>	68
4.2 PARTE 2: POTENCIAL AÇÃO ANTI-HIPERGLICÊMICA DE UM TRITERPENO DERIVATIVO (T2).....	75
4.2.1 Efeito do extrato bruto das folhas de <i>C. heterodoxus</i> (EB-CH), triterpeno natural (T1) e triterpeno derivativo (T2) na curva de tolerância à glicose	75
4.2.2 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na concentração de insulina sérica	77
4.2.3 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na captação de ^{14}C -glicose nas ilhotas pancreáticas de rato <i>in vitro</i>	77
4.2.4 Efeito do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas	78
4.2.4.1 Curva tempo-dependente e concentração-resposta do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos euglicêmicos ...	78
4.2.4.2 Envolvimento de canais de K^+ no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	79
4.2.4.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório do T2 no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$	82
4.2.4.4 Envolvimento da PKC e PKA no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	83
4.2.5 Efeito do triterpeno derivativo (T2) no trânsito de vesículas de insulina nas ilhotas pancreáticas	83
4.2.6 Efeito de T1 e T2 na atividade da LDH	87

4.2.7 Discussão.....	88
4.3 PARTE 3: AÇÃO DO TRITERPENO DERIVATIVO (T2) NO INTESTINO.....	93
4.3.1 Efeito do triterpeno derivativo (T2) e sitagliptina na curva de tolerância à glicose.....	93
4.3.2 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na concentração sérica de GLP-1.....	93
4.3.3 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na atividade de DPP-IV <i>in vitro</i>	93
4.3.4.1 Curva de concentração-resposta e tempo-dependente do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal.....	96
4.3.4.2 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal.....	97
4.3.4.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) e cálcio intracelular no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal.....	97
4.3.4.4 Envolvimento da PKC e PKA no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal.....	101
4.3.5 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na atividade das dissacaridases intestinais.....	102
4.3.6 DISCUSSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICE A – Cromatograma da fração de derivado p-nitrobenzoilado de hexano de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol.....	127
APÊNDICE B – Espectros de RNM COSY de derivado p- nitrobenzoilado de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol.....	129
APÊNDICE C – Espectros de HMBC de derivado p-nitrobenzoilado de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol.....	131
APÊNDICE D – Espectros de HMQC de derivado p-nitrobenzoilado do fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol.....	141

1. INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELITO (DM): EPIDEMIOLOGIA, CAUSAS, ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

A DM é considerada um grave problema de saúde pública, sendo classificada pela Associação Americana de Diabetes como uma epidemia global. O aumento da prevalência da doença nas diversas regiões do planeta vem sendo apontado como um dos mais expressivos fenômenos clínico-epidemiológicos da atualidade (Wild *et al.*, 2004). A DM apresenta uma patologia complexa que compromete o indivíduo em dimensões fisiológicas, psicológicas e sociais, afetando pessoas de diferentes idades, sexos e condições socioeconômicas. Pesquisas sobre a DM despertam os interesses de pesquisadores de todo mundo, sendo intensamente estudada em diversos aspectos (Ahlqvist, Ahluwalia e Groop, 2011; Alberti e Zimmet, 2014; Kahn, Cooper e Del Prato, 2014).

Mundialmente, cerca de 415 milhões de pessoas são portadores de DM. A doença atinge majoritariamente indivíduos entre 40 e 59 anos; e 80% residem em países em desenvolvimento. Atualmente, o Brasil é o quarto país com maior número de portadores, 14,3 milhões (9,04%) entre 20 e 79 anos (IDF, 2015). Pesquisas nacionais encontraram taxas mais elevadas, como 13,5% em São Carlos (Bosi *et al.*, 2009) e 15% em Ribeirão Preto (São Paulo)(Moraes *et al.*, 2010). Estudos prospectivos apontam que em 2040 a prevalência mundial será de 642 milhões e 19,2 milhões no País (Wild *et al.*, 2004).

Do ponto de vista clínico, a DM pode ser definida como um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, a qual é o resultado de defeitos na ação e/ou secreção de insulina (ADA, 2004). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2014), são aceitos três critérios para o diagnóstico da doença, utilizando como parâmetro a glicemia (miligrama de glicose por decilitro de sangue, mg/dL): **1.** Sintomas de poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso acrescidos de glicemia casual >200 mg/dL; **2.** Glicemia de jejum \geq 126 mg/dL; **3.** Glicemia de 2 h pós-sobrecarga de 75 g de glicose >200 mg/dL. Além disso, a medida da hemoglobina glicada >6,5% associada a outros sinais clínicos é utilizada como diagnóstico da DM.

A DM é classificada de acordo com a etiologia: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM e DM gestacional. A DM1 é a forma encontrada em 5 a 10% dos casos, sendo caracterizada pela deficiência da secreção de insulina que é resultante da

destruição de células β pancreáticas (ADA, 2004). Em geral, o dano celular está relacionado à presença de marcadores de auto-imunidade contra as células β pancreáticas, porém, alguns pacientes não apresentam o processo auto-imune, sendo referido como forma idiopática da DM1 (Stefan *et al.*, 2001; Kenneth e Polonsky, 2012). Já, a DM2, tipo presente em 90 a 95% dos casos, é resultado principalmente da resistência à ação da insulina (Stolerman e Florez, 2009). Embora as bases genéticas transmissíveis (Ahlqvist, Ahluwalia e Groop, 2011) da DM sejam inquestionáveis, isoladamente são insuficientes para explicar o alarmante aumento da incidência dessa doença em curto tempo; tal acréscimo pode ser devido às mudanças comportamentais ocorridas nas últimas décadas. As tendências genéticas da DM apresentam maior expressão diante das transformações no padrão alimentar associado aos baixos níveis de atividades físicas observado na sociedade em consequência do processo de modernização (Ahlqvist, Ahluwalia e Groop, 2011; Kahn, Cooper e Del Prato, 2014).

A preocupação com a DM se remete ao fato de estar associada às diversas complicações agudas e crônicas, tais como: doenças micro e macrovasculares, retinopatia, neuropatia, nefropatia, doença arterial coronariana e coma, aumentando o risco de óbito. As complicações clínicas da DM dependem da duração da doença, sendo que o maior tempo de exposição aos efeitos deletérios da hiperglicemia aumenta o risco de desenvolvê-las (Koopman *et al.*, 2006; Karmakar *et al.*, 2011).

1.2 PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (AGES, [DO INGLÊS, ADVANCED GLYCATION END-PRODUCTS]) ASSOCIADOS ÀS COMPLICAÇÕES DA DM

Os AGEs formam uma classe de moléculas heterogêneas sintetizadas a partir de reações bioquímicas de natureza não enzimáticas. As interações amino carbonila, entre açúcares redutores ou lipídeos oxidados e proteínas, aminofosfolipídeos ou ácidos nucleicos geram os AGEs (Peppas, Uribarri e Vlassara, 2003; Goh e Cooper, 2008).

No quadro de hiperglicemia, a glicotoxicidade relacionada aos AGEs resulta em modificação de proteínas intracelulares, resultando em disfunção celular em diversos tecidos do organismo (Lin *et al.*, 2016; Lubitz *et al.*, 2016). Além disso, os AGEs presentes na circulação apresentam receptores específicos, por meio dos quais estimulam a produção de citocinas inflamatórias, como a interleucinas 1 e 6, hormônio de crescimento, fator de necrose tumoral α , prostaglandinas e

fator estimulador de colônias de granulócitos (Brownie, 2005; Feng *et al.*, 2016).

A hiperglicemia prolongada promove a formação de AGEs, que por sua vez levam a morte celular e estresse oxidativo no tecido vascular. Nos rins, os AGEs promovem disfunção mitocondrial, estresse de retículo e estresse oxidativo que estão relacionados a nefropatia diabética (Lindblom *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Nos nervos, os AGEs promovem a glicação da bainha de mielina, desmielinização e degeneração de neurônios periféricos que está associada a neuropatia diabética (Stolzing *et al.*, 2006; Sugimoto, Yasujima e Yagihashi, 2008).

Os mecanismos de formação de AGEs não foram completamente elucidados, uma vez que inúmeras vias estão envolvidas. Um dos mecanismos implicados na formação de AGEs é a reação de *Maillard* que inicia com a condensação do grupamento carbonila de um açúcar redutor com um grupamento amina. Em seguida, uma estrutura estável, o produto de Amadori, ocorre por rearranjos na base de Schiff. Os produtos de Amadori apresentam grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos primários acessíveis, originando os AGEs. Em resumo, a reação de Maillard, pode ser subdividida em três etapas principais: (1) formação da base reversível de Schiff e produtos de Amadori estáveis, (2) rearranjos destes compostos em estruturas químicas mais complexas e reativas e, finalmente, (3) formação dos AGEs, que são acumulados em proteínas de longa vida (Wautier e Guillausseau, 2001).

No caso da hemoglobina A, a glicação ocorre por uma reação entre glicose (açúcar redutor) e o grupamento amino-terminal do aminoácido valina da cadeia β , formando uma base de Schiff (Wautier e Guillausseau, 2001). A determinação dos produtos de glicação pode ser mensurada pela dosagem das concentrações séricas de hemoglobina glicada, que é um indicador útil da média de glicose sanguínea de um indivíduo durante as últimas semanas, sendo prática comum na avaliação clínica de pacientes com DM (SBD, 2014, p. 352).

1.3. INSULINA

Para compreensão dos mecanismos bioquímicos relacionados à etiopatologia e tratamento da DM, é necessária a caracterização dos mecanismos de biossíntese, secreção e ação da insulina.

1.3.1 Histórico: a descoberta da insulina

As primeiras descrições sobre a DM datam de 1500 a.C. por egípcios. Desde então, a história do tratamento da DM é pontuada por avanços e retrocessos. A descoberta de Thomas Cawley, em 1788, constituiu um marco referencial quando publicou um trabalho sugerindo a relação entre a DM e pâncreas. Esta hipótese foi confirmada em 1889 por Joseph Von Mering e Oskar Minkowski por meio de experimentos utilizando a pancreatectomia em cães. Em 1910, Edward Albert Sharpey-Schafer sugeriu que a DM estaria relacionada à deficiência de uma substância produzida pelo pâncreas; utilizou pela primeira vez o termo insulina. Finalmente, em 1921, Frederick Banting e Charles Best comprovaram a existência da insulina quando reverteram a DM em cães por meio de um tratamento com extrato de ilhotas pancreáticas. Foram James Collip e John McLeod que utilizaram pela primeira vez o hormônio purificado do pâncreas de bovinos para o tratamento de pacientes. Estas descobertas representaram grandes avanços na compreensão da patogênese da DM e renderam a Banting e McLeod o prêmio Nobel de Medicina de 1923 (Cruz, 2009).

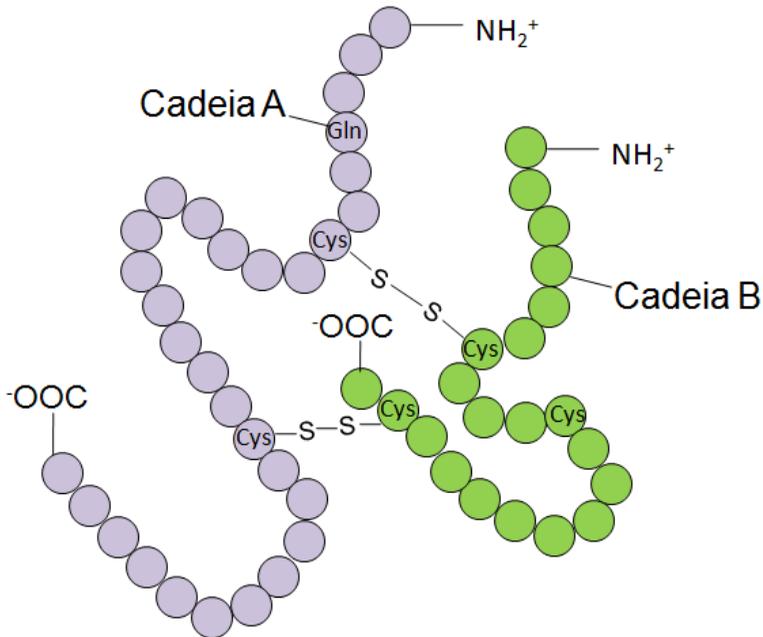
1.3.2 Biossíntese de insulina no pâncreas

O pâncreas é composto por duas porções de morfologia e fisiologia distintas: a porção exócrina, que representa a maior parte do tecido pancreático, é formada por células acinares e é responsável pela síntese e secreção de enzimas digestivas na forma de zimogênio no duodeno; a porção endócrina, formada pelas ilhotas de Langerhans, sintetiza hormônios relacionados ao metabolismo de carboidratos, como a insulina (Weiss, 2008; Ellis, 2013). Nas ilhotas de Langerhans foram identificadas cinco tipos de células que sintetizam respectivamente: 1. células PP, polipeptídeo pancreático; 2. células ϵ , grelina; 3. células δ , somatostatina; 4. células α , glucagon; e 5. células β , insulina (Mastracci e Sussel, 2012).

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico, cuja síntese ocorre no retículo endoplasmático rugoso a partir de um precursor de 110 aminoácidos, a pré-pró-insulina. Nesta organela, ocorre a clivagem do hormônio, sendo convertido à pró-insulina, composta por duas cadeias (A e B), ligadas por um peptídeo C. No complexo de Golgi, ocorre a proteólise que leva a separação do peptídeo C. O resultado é a insulina, composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias polipeptídicas, A e B, estabilizadas por ligações dissulfeto,

apresentando, respectivamente, 21 e 30 resíduos de aminoácidos (figura 1). A insulina recém-formada é armazenada em vesículas nas células β (Norman e Litwack, 1997; Smith, Marks e Lieberman, 2005).

Figura 1. Estrutura da insulina.



1.3.3 Secreção de insulina

No jejum, a secreção de insulina é mínima, na ordem de 25 ng/min/kg de peso corporal, o que caracteriza atividade fisiológica discreta (Gual, Marchand-Brustel e Tanti, 2005). Após a ingestão de nutrientes, a secreção ocorre em duas fases, das quais a primeira é fundamental para a utilização de glicose de origem alimentar. A concentração plasmática de insulina aumenta em torno de 10 vezes entre 3 e 5 min, pela liberação imediata do hormônio pré-formado e armazenado nas ilhotas de Langerhans. Porém, a secreção diminui pela metade num período de 5 a 10 min. Na segunda fase, após aproximadamente 15 min, a concentração de insulina está elevada. A síntese da insulina garante que a glicemia seja mantida em valores basais (Steiner e Oyer, 1967).

Os mecanismos citados são altamente regulados em indivíduos não diabéticos, por outro lado indivíduos diabéticos e, até mesmo pré-diabéticos, apresentam marcantes alterações na secreção do hormônio. No quadro de DM1, a secreção de insulina torna-se progressivamente diminuída até ocasionar hiperglicemia, sendo necessário o tratamento baseado no hormônio insulina. Por outro lado, no DM2 é característica a observação da hiperinsulinemia, já que as células β pancreáticas tendem a produzir insulina em excesso a fim de contrabalançar a resistência à insulina e ajustar a glicose sérica (estágio inicial da doença). A DM2 progride e os danos ao tecido pancreático levam a redução na secreção de insulina (estágio tardio da doença) (Kahn, 2001; Kaufman, 2011). Indivíduos com DM2, que apresentam resistência à insulina, podem exibir perda da primeira fase de secreção da insulina (Del Prato e Tiengo, 2001; Festa *et al.*, 2008). Estudos com o grupo populacional dos indígenas Pima (América do Norte) indicaram que o surgimento do quadro de pré-diabetes e DM está relacionado ao ganho de peso, piora da sensibilidade à insulina e à deterioração da primeira fase de secreção de insulina (Schulz, 1993; Schulz *et al.*, 2006).

1.3.4 Mecanismo de secreção de insulina nas células β pancreáticas

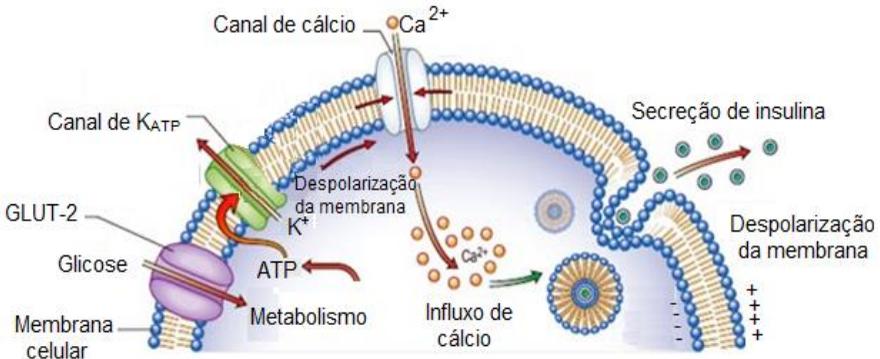
No estado pós-prandial, as células β pancreáticas são expostas à elevada concentração de glicose, que é internalizada por meio do transportador de glicose 2 (GLUT 2) (Youngreen, 2007). Em seguida, a glicose é fosforilada numa reação catalisada pela enzima glicocinase no citosol e metabolizada a piruvato pela via glicolítica, resultando na síntese de ATP (Newsholme, Gaudel e Mcclenaghan, 2010). O aumento da taxa citosólica ATP/ADP inibe a permeabilidade do íon potássio (K^+) através dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}) e resulta na despolarização da membrana plasmática das células β pancreáticas (Gilon e Henquin, 2001; Xu *et al.*, 2015) e consequente abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem (CCDV). O aumento da condutância do íon cálcio (Ca^{2+}) favorece o aumento da concentração citosólica deste, que por sua vez, estimula o processo exocitótico dos grânulos de insulina (Berridge, Bootman e Roderick, 2003; Komatsu *et al.*, 2013) (figura 2). Na célula em repouso, a concentração de Ca^{2+} citoplasmática é de 100 nM. Na célula estimulada, a concentração do íon eleva-se para aproximadamente 1 μ M (Krauss, 2003).

Canais K^+_{ATP} foram descritos pela primeira vez no músculo cardíaco (Noma, 1983) e atualmente é conhecido que são expressos em vários tecidos, entre eles, músculo liso e esquelético, neurônios, axônios

periféricos, células epiteliais e células β pancreáticas. Nas células β , os canais K^+_{ATP} são formados por quatro subunidades formadoras do poro denominadas canais de potássio com retificação interna (Kir 6.x, do inglês *inward rectifying potassium 6.x*), com dois domínios transmembrana acoplados a quatro subunidades reguladoras denominadas receptores de sulfonilureia (SUR, do inglês *sulfonylurea receptor*) com dezessete domínios transmembrana (Nenquin e Henquin; Ashcroft e Gribble, 1999). SUR possui o sítio de ligação para o ADP (ativa o canal) e para sulfonilureias (bloqueia o canal) (Principalli *et al.*, 2015). Na ausência de glicose, os canais K^+_{ATP} apresentam elevada probabilidade de abertura e mediam o fluxo de K^+ com a finalidade de manter o equilíbrio do potencial de membrana (Tucker *et al.*, 1997; Mikhailov *et al.*, 1998). Efeito semelhante é mediado pelos fármacos antidiabético sulfonilureia por meio de uma interação com SUR1 nas células β (Ahn, Kim e Yoo, 2015), que leva ao estímulo da secreção de insulina, mesmo na ausência de glicose. Outro grupo de canais de potássio relacionados com a resposta a insulina são os canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) e os canais de potássio sensíveis a cálcio (K^+-Ca) (Sandhiya e Dkhar, 2009).

Os canais CCDV são proteínas multiméricas amplamente distribuídas em diversas células do organismo. A subunidade $\alpha 1$ possui o sensor de voltagem para o canal: os aminoácidos arginina (carregada positivamente) e resíduos de lisina (Kamp e Hell, 2000; Wu *et al.*, 2015). Bloqueadores do canais tipo L em doses elevadas são suficientes para inibir a secreção de insulina em mamíferos. CCDV-L são considerados efetores na secreção de insulina (Kamp e Hell, 2000; Wu *et al.*, 2015). Inúmeros receptores acoplados a proteína G atuam na regulação de CCDV-L por meio da via proteína cinase A (PKA)/AMPc e associada a ativação de PKC (Kamp e Hell, 2000). O *crosstalk* entre as vias PKA e PKC também já foi documentado em diversos tecidos. Alternativamente, os receptores acoplados a proteína G regulam a concentração de cálcio intracelular por estimular a fosfolipase C, que por sua vez hidrolisa a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) em inositol trifosfato e diacilglicerol (DAG). O DAG e Ca^{2+} podem ativar os CCDV-L, além disso DAG ativa PKC (Kamp e Hell, 2000).

Figura 2 - Representação esquemática da célula β pancreática e mecanismo de secreção de insulina.



Fonte: Baseado em Berriedge, Bootman e Roderick (2003)

1.3.5 Mecanismo de ação da insulina

Após a secreção da insulina na circulação, a sinalização intracelular do hormônio inicia com a interação com o receptor específico de membrana, denominado receptor de insulina, em diferentes tecidos (Saltiel e Kahn, 2001 ; Youngreen, 2007). A ativação do receptor estimula a fosforilação no aminoácido tirosina de diversos substratos, entre eles, substratos do receptor de insulina (SRI) (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Kanzaki, 2006). A fosforilação das proteínas SRI leva a criação de sítios de ligação para outras proteínas como a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), que é ativada. A PI3K é fundamental na regulação da mitogênese, diferenciação celular e efeitos metabólicos estimulados pela insulina. É um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3 fosfato, fosfatidilinositol-3,4 bisfosfato e fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato. A ativação da PI3K aumenta a fosforilação em serina e treonina da proteína cinase B (Akt) (Lietzke *et al.*, 2000; Aoyagi *et al.*, 2010).

Entre outras funções, a Akt atua aumentando a captação periférica de glicose por aumentar a translocação de transportadores de glicose do citoplasma para a membrana plasmática, o que resulta em

captação celular de glicose por difusão facilitada após a ingestão alimentar. A homeostasia da glicose no período pós-prandial é marcadamente relacionada à expressão de transportadores de glicose nos tecidos, muscular esquelético, adiposo e cardíaco (Scheepers, Joost e Schurmann, 2004).

Defeitos nos mecanismos moleculares de sinalização intracelular da insulina citados acima promovem à resistência a este hormônio, estando associado à etiologia da DM2 (Chiang *et al.*, 2001; Sheena *et al.*, 2011).

1.4 ABSORÇÃO DE GLICOSE NO INTESTINO

Na dieta ocidental, os carboidratos correspondem de 50 a 60% da ingestão energética diária, principalmente amido e sacarose. Outros carboidratos da dieta compreendem os polímeros de glicose (glicogênio e celulose), dissacarídeos (lactose e maltose) e monossacarídeos (glicose e frutose). A absorção intestinal de carboidratos é restrita aos monossacarídeos, desse modo, poli e oligossacarídeos desencadeiam processos digestivos enzimáticos para formar unidades mais simples que são desta forma absorvidas pelos enterócitos (Smith, Marks e Lieberman, 2005).

As enzimas α -glicosidases (α -amilase, trealose-6-fosfato hidrolase, sacarase e maltase) e as β -glicosidases (β -glicosidase, β -galactosidase, β -glicuronidase e β -D-acetilhexosaminidase) se localizam nos enterócitos que revestem as microvilosidades intestinais e apresentam importante função de participar no processamento de oligossacarídeos ingeridos, tornando-os disponíveis para a absorção na forma de monossacarídeos. As α -glicosidases hidrolizam a ligação glicosídica do final da cadeia carbônica, liberando α -glicoses da porção não redutora. Algumas α -glicosidases podem hidrolizar, não apenas oligossacarídeos e α -glicosídeos sintéticos contendo ligações α -glicosídicas, mas também α -glicanos solúveis em água como o amido e o glicogênio. As transglicosidases possuem a atividade hidrolítica e de transglicosilação, catalisando, respectivamente, dois tipos de reações, uma envolvendo a transferência de resíduo de D-glicose do lado não redutor de oligossacarídeo para molécula de água (hidrólise), ou a transferência deste resíduo para uma unidade aceptora (transglicosilação). Nestas reações, D-glicose é liberada como anômero α , retendo a configuração do substrato no carbono anomérico (C-1) no produto de transglicosilação (Krasikov, Karelov e Firsov, 2001).

Após a clivagem dos polissacarídeos em monossacarídeos pela ação das glicosidases, os açúcares são transportados das células epiteliais do intestino para o sangue para a distribuição a todos os tecidos. Em mamíferos, o transporte de glicose e de outros monossacarídeos pode ocorrer na membrana por transporte facilitado, mediado por transportadores de membrana específicos, GLUT e o transportador de glicose dependente de sódio (SGLT) (Scheepers, Joost e Schurmann, 2004; Silva *et al.*, 2013).

1.5 EIXO ÊNTERO-INSULAR

O eixo êntero-insular constitui um sistema de sinalização por meio dos quais células endócrinas intestinais secretam hormônios incretinas, que potencializam a secreção de insulina estimulada por glicose. Na década de 80, Nauck *et al.* (1986; 1987) descreveram o “efeito incretina” por meio de importantes estudos nos quais a resposta secretória de células β foi avaliada durante o teste de tolerância a glicose e estudo de *clamp* isoglicêmico em seres humanos. Eles concluíram que o grau de secreção de insulina é diretamente proporcional à quantidade de glicose ingerida, sendo os hormônios incretinas responsáveis por 75% da resposta insulínica após a ingestão de 50 gramas (g) de glicose. O efeito incretina é definido por maior aumento da secreção de insulina quando a glicose é administrada oralmente se comparado com a administração parenteral de uma infusão isoglicêmica (Nauck *et al.*, 2011b).

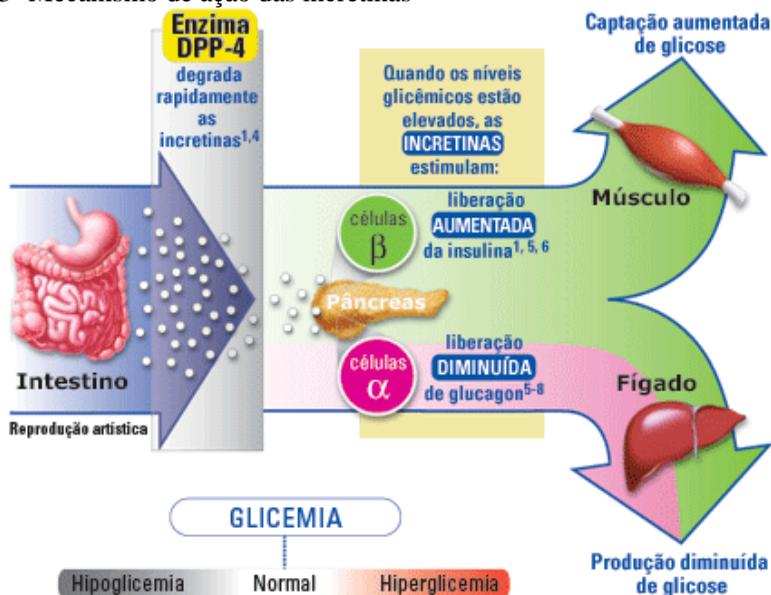
Atualmente, é reconhecido que o efeito incretina é mediado pela ação neuroendócrina de dois peptídeos intestinais insulínotropicos: peptídeo semelhante ao glucagon-1 (GLP-1) e polipeptídeo insulínotropico dependente de glicose (GIP), que são secretados de modo proporcional à ingestão calórica pelas células enteroendócrinas “L” (íleo distal e cólon intestinal) e “K” (duodeno), respectivamente. GLP-1 e GIP contribuem para o efeito incretina, entretanto o último apresenta efeito menos potente (Baggio e Drucker, 2007; Nauck, 2011).

O GLP-1 é secretado, no intestino, principalmente na forma GLP-1 (7-36 aminoácidos) NH₂ e em menores concentrações na forma GLP-1(7-37 aminoácidos). Ambos são capazes de interagir com receptores específicos nas células β pancreáticas, trato gastrointestinal e sistema nervoso central. A concentração plasmática máxima de GLP-1 após a ingestão alimentar é de aproximadamente 20 pM (Ahren *et al.*, 2004).

O GLP-1 apresenta meia vida plasmática curta, de 1 a 2 min, já que é rapidamente degradado para uma forma inativa pela enzima

proteolítica dipeptidilpeptidase-IV (DPP-IV), pelo qual cliva os dois aminoácidos do grupo N-terminal de ambos os peptídeos produzindo metabólitos menos ativos, como o GLP-1(9-36) amida (Vahl *et al.*, 2003). Desse modo, estudos com o objetivo de prevenir e tratar complicações clínicas da DM tem enfoque em técnicas que visam potencializar a ação/concentração de GLP-1 e/ou inibir DPP-IV (Ahren *et al.*, 2004; Baggio *et al.*, 2004) (figura 3).

Figura 3- Mecanismo de ação das incretinas



Fonte: Baseado em Nauck (2011)

O efeito do GIP na secreção de insulina estimulada por glicose é diminuído quando a glicemia se encontra em concentração suprafisiológica. Por outro lado, o GLP-1 estimula a secreção de insulina em indivíduos não diabéticos e diabéticos, independente da concentração plasmática de glicose (Nauck *et al.*, 1993; Nauck *et al.*, 2011a; Nauck, 2011b). Atualmente, é reconhecido que além da função de estimular a secreção de insulina mediada por glicose, o GLP-1 atua inibindo a concentração de glucagon, com supressão da gliconeogênese, diminuindo a taxa de esvaziamento gástrico e aumenta a saciedade (Nauck, 2011).

Um dos mecanismos para secreção de insulina estimulada por GLP-1 envolve a ativação do receptor de GLP-1 (GLP-1R) expressos nas células β pancreáticas. Estudos de eletrofisiologia em células β isoladas concluíram que GLP-1R ativa canais CCDV-L e PKC (Shigeto *et al.*, 2015). É descrito que GLP-1 ativa a fosfolipase C (PLC), que aumenta a geração de DAG e inositol trifosfato (IP₃) que aumentam, respectivamente, ativação de PKC e mobilização do cálcio intracelular, os quais resultam na ativação de canais permeáveis a sódio (TRPM 4 e 5) (Shigeto *et al.*, 2015). O efeito promotor da despolarização da célula β por GLP-1 é percebido quando células são tratadas com agonista de PKC. GLP-1 também promove o fechamento de canais K_{ATP} que estimula as vias envolvendo PKA e a produção intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que induz o fechamento dos canais K_{ATP} e abertura de canais CCDV, resultando na secreção de insulina (Ashcroft e Rorsman, 2012). Porém, estudos eletrofisiológicos recentes em células β isoladas concluíram que o efeito estimulatório de secreção de insulina promovido por GLP-1 persiste na presença do inibidor de PKA (Shigeto *et al.*, 2015).

Estudos diversos sugerem que outros mecanismos estão envolvidos da secreção de insulina estimulada por GLP-1, entre eles, a mediação neuronal por ativação de reflexos vago-vagal (Holst, 2007) e glutamato (Gheni *et al.*, 2014)

1.5.1 Regulação da secreção de GLP-1 no intestino

A ingestão de nutrientes é o estímulo fisiológico primário para a secreção bifásica de GLP-1 pelas células enteroendócrinas L. A primeira fase ocorre entre 15 a 30 min após a ingestão alimentar; a segunda fase apresenta um pico menor e ocorre entre 90 e 120 min após a refeição. Glicose e gordura administradas a pacientes via oral ou enteral ou, ainda, em segmentos de íleo perfundido estimulam a secreção de GLP-1. Por outro lado, as proteínas não estão envolvidas no mecanismo secretório de incretinas nas células L (Nauck *et al.*, 1986; 1987).

Até o momento, são escassos os trabalhos demonstrando a via de sinalização intracelular envolvidas nos efeitos secretagogos de GLP-1 nas células enteroendócrinas L, entretanto, o desenvolvimento de modelos *in vitro* em células murinas e de células L de intestino humano permitiu uma evolução no conhecimento. Além disso, muitos conhecimentos a respeito da via de sinalização são assumidos por extrapolação a partir do que é conhecido em outras células endócrinas (Vahl *et al.*, 2003; Nauck *et al.*, 2011b).

Estudos eletrofisiológicos demonstraram efeitos da glicose na alteração do potencial da membrana das células L murina por meio do fechamento de canais K_{ATP} , bem como devido a despolarização. A ausência de RNAm de GLUT 2 nas células L murinas sugerem que o transporte de glicose pode ocorrer por meio de SGLT. A abertura de CCDV em células L também está associada à secreção de GLP-1. Coletivamente, estes estudos demonstram que os mecanismos de estímulo de secreção de GLP-1 por células L podem ser semelhantes àqueles de secreção de insulina estimulada por glicose nas células β pancreáticas (Aharen *et al.*, 2004; Nauck, 2011; Shigeto *et al.*, 2015).

1.6 REGULAÇÕES DA HOMEOSTASIA DA GLICOSE

A glicose é fundamental ao organismo humano por ser importante substrato metabólico em diversas reações bioquímicas e fonte de energia para variados tipos de células, além de ser fonte exclusiva de energia para as hemácias (Hardie, 2012). A glicose sérica é derivada de três fontes: a) absorção intestinal da glicose dos alimentos; b) glicogenólise, glicose produzida a partir das reservas de glicogênio hepático; c) gliconeogênese, síntese de glicose via substrato não carboidrato, particularmente lactato, aminoácidos e glicerol. A concentração de glicose no sangue é mantida nos valores de 70 a 110 mg/dL em indivíduos não diabéticos e é controlada por mecanismos que envolvem diversos órgãos, intestino, fígado, pâncreas, músculo esquelético, tecido adiposo e rins (ADA, 2004; SBD, 2014). A regulação é resultado, principalmente, da ação dos hormônios insulina e glucagon, secretados, respectivamente, pelas células pancreáticas β e α , que atuam de modo oposto (Alberti e Zimmet, 2014).

Durante o jejum, as células α secretam glucagon em resposta a baixa concentração de glicose no sangue. Inicialmente, a glicemia é mantida por meio da glicogenólise, porém o glicogênio é uma reserva limitada e somente é capaz de suprir a demanda de glicose no organismo por algumas horas de jejum (Ferrer *et al.*, 2003). Posteriormente, a glicemia é sustentada, predominantemente, pela gliconeogênese hepática, que pode ser definida como a síntese de glicose a partir de compostos diferentes da glicose, como lactato, aminoácidos e glicerol, com o consumo de ATP originário de ácidos graxos, principalmente. Além disso, o fígado capta ácidos graxos liberados pela mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo, os quais são utilizados para a síntese de corpos cetônicos com a finalidade de fornecer um nutriente alternativo à glicose; por outro lado, a beta-oxidação encontra-se diminuída no

fígado. No tecido muscular, a captação de glicose é reduzida o que o torna altamente dependente da oxidação de ácidos graxos para obtenção de energia. Além disso, ocorre aumento da glicogenólise e proteólise muscular. Já no tecido adiposo, ocorre ativação da lipólise com elevação da liberação de ácidos graxos e glicerol, que servem como precursores gliconeogênicos e cetogênicos no fígado (Beardsall *et al.*, 2003; Moore, Cherrington e Wasserman, 2003). GLP-1 e GIP se mantêm em concentrações fisiológica durante o jejum (Nauck, 2011).

No período pós-prandial, ocorre o aumento da captação de glicose pelos tecidos periféricos estimulada pela insulina. Grande parte dos carboidratos, aminoácidos e uma pequena parte dos triglicerídeos dietéticos são diretamente transportados através da veia porta, ao fígado que é o órgão central na manutenção da homeostasia dos nutrientes. A insulina é sintetizada e liberada proporcionalmente a quantidade de glicose sanguínea. Este hormônio inibe a glicogenólise, por outro lado estimula a síntese hepática de ácidos graxos, que são transportados por meio das lipoproteínas transportadoras (VLDL) até o tecido adiposo, local onde serão armazenados. No fígado, a insulina atua estimulando a glicogênese por atuação da enzima glicogênio sintase. No tecido adiposo, a insulina estimula a captação de glicose e promove a lipogênese. O aumento da atividade da lipoproteína lipase libera ácidos graxos das lipoproteínas para a síntese de triglicerídeos e inibe a lipase hormônio-sensível, enzima responsável pela lipólise. No músculo, a insulina também possui um efeito anabólico, promovendo a entrada de aminoácidos nas células e estimula a síntese proteica e inibe a degradação (Taha e Klip, 1999; Beardsall *et al.*, 2003; Moore, Cherrington e Wasserman, 2003). Adicionalmente, no período pós-prandial ocorre a liberação de inúmeros peptídeos e neurotransmissores, incluindo os hormônios incretinas (GIP e GLP-1) (Ashcroft e Rorsman, 2012).

No quadro de pré-diabetes ou DM, a deficiência relativa ou absoluta da insulina leva a severas disfunções nos principais órgãos-alvos da insulina, tais como, fígado, tecido adiposo e músculo esquelético (Petersen *et al.*, 2007). A baixa concentração ou ação da insulina pode levar ao aumento das concentrações glicêmicas, redução da captação de glicose pelos tecidos periféricos e redução da lipogênese e da síntese proteica, com os aminoácidos sendo utilizados como substrato para a gliconeogênese. Além disso, ocorre ativação da produção hepática de glicose e aumento da lipólise no tecido adiposo, com consequente elevação de ácidos graxos na circulação (Moore, Cherrington e Wasserman, 2003).

1.7 TERAPIA DA DM

O tratamento da DM é baseado principalmente na prática de exercícios físicos, terapia nutricional e o uso de medicação específica. No quadro de DM1, esta é feita basicamente à base de insulina, enquanto que na DM2 incluem o uso de hipoglicemiantes orais. As formas de tratamento disponíveis atualmente são insuficientes para grande parte dos pacientes (Mollema *et al.*, 2000; Peyrot, Rubin e Lauritzen, 2005).

Alternativas da utilização de novas substâncias exógenas como: compostos provenientes de plantas medicinais, metabólitos de compostos naturais e/ou análogos são práticas cada vez mais difundida. Porém, o tratamento pode ser prejudicial ao paciente devido à falta de comprovação científica da ação e do mecanismo de atuação destas substâncias (Adachi, Yoshikawa e Sakurai, 2007; Soltész *et al.*, 2007; Cazarolli *et al.*, 2009).

O desenvolvimento tecnológico-científico de medidas terapêuticas desperta o interesse de pesquisadores de todo o mundo. Diversos compostos surgem como possíveis alvos no tratamento da DM, entre eles se destacam aqueles com capacidade de estimular a secreção e ação da insulina ou com características insulinomiméticas (Adachi, Yoshikawa e Sakurai, 2007; Soltész *et al.*, 2007; Zanatta *et al.*, 2008; Cazarolli *et al.*, 2009). Inclusive se destaca a descoberta de novos compostos isolados e sintéticos, entre eles os terpenóides.

O presente grupo de pesquisa, em colaboração com outros, já obteve alguns resultados interessantes e encorajadores relacionados à regulação da homeostasia da glicose. Foi demonstrado o efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante de diversas espécies de plantas brasileiras (Cazarolli *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010; Kappel *et al.*, 2013), incluindo triterpenos naturais (Castro *et al.*, 2014b; Castro *et al.*, 2015).

1.7.1 Tratamento medicamentoso

Os antidiabéticos orais podem ser requeridos quando as metas de controle glicêmico não são alcançadas por meio do tratamento não medicamentoso. Estes fármacos podem atuar estimulando a secreção da insulina, melhorando a sensibilidade à insulina, reduzindo a absorção de glicose ou por meio de um mecanismo que inclua o aumento da secreção de insulina e redução da secreção de glucagon (incretinas). Ainda, faz

parte das medidas terapêuticas a utilização da insulina exógena (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; Lyra e Cavalcanti, 2009).

Os antidiabéticos orais podem ser classificados em três categorias, segundo a SBD (2014): agentes que aumentam a secreção de insulina, agentes que não aumentam a secreção de insulina e, a mais recente categoria, agentes que aumentam a secreção de insulina de modo dependente de glicose.

▪ **Agentes que aumentam a secreção de insulina:** são os hipoglicemiantes, secretagogos de insulina, tais como: 1. sulfonilureias, que apresentam ação hipoglicemiante mais prolongada (clorpropamida, glibenclamida, gliclazida, glipizida e glimepirida); 2. glinidas, com tempo de ação mais curto, atuando principalmente no período pós-prandial. Porém, o uso deste favorece o ganho de peso e hipoglicemia (Aguilar-Bryan *et al.*, 1995; SBD, 2014).

▪ **Agentes que não aumentam a secreção de insulina:** são anti-hiperglicemiantes e atuam por diferentes mecanismos de ação: 1. os inibidores de α -glicosidases (acarbose) reduzem a velocidade de absorção intestinal da glicose predominantemente no período pós-prandial. 2. As biguanidas (metformina) diminuem a produção hepática de glicose e promove uma discreta melhora da sensibilidade à insulina. 3. As glitazonas melhoram a resistência à insulina nos tecidos muscular, adiposo e hepático. Por outro lado, os severos efeitos colaterais, retenção hídrica e risco aumentado de insuficiência cardíaca, resultaram na proibição de vários fármacos dessa classe do comércio no Brasil e em outros países (Fowler, 2007; SBD, 2014).

▪ **Agentes que aumentam a secreção de insulina dependente de glicose e que diminuem a secreção de glucagon:** constituem a mais nova classe de antidiabéticos, sendo indicados para portadores de DM2 como terapia associada a outros antiabéticos orais. São classificados em: 1. Inibidores de DPP-IV, cujo mecanismo de ação se baseia na estabilização de GLP-1 endógeno pela inibição de DPP-IV (gliptinas, tais como sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina e linagliptina). As sociedades brasileira, americana e europeia de DM orientam a utilização associada a outros antiabéticos orais e insulina; 2. Míméticos de GLP-1 (exanatina); 3. Análogo de GLP-1 (liraglutida). Os dois últimos são utilizados por via subcutânea e apenas a liraglutida é aprovada para uso em monoterapia (Ahren, 2006; Herman *et al.*, 2007; SBD, 2014).

1.7.2 Plantas medicinais

As plantas são utilizadas como forma de tratamento desde o início da civilização (Grover, Yadav e Vats, 2002) e constituem uma forma importante de obter substâncias biologicamente ativas, das quais inúmeras podem ser utilizadas como modelo para a síntese de fármacos devido a grande diversidade estrutural e às propriedades químicas e biológicas. Cerca de 30 % do total de fármacos disponíveis no mercado são originados das plantas (Calixto, 2000).

Baseado nos estudos etnofarmacológico, diversas espécies vegetais são alvos de estudos científicos em relação aos efeitos na DM. Alguns dos mecanismos de ação envolvem o aumento da secreção de insulina, alteração do metabolismo da glicose, inibição e aumento da síntese de enzimas ou atenuação das complicações da DM. Dentre os compostos ativos isolados de plantas com atividade antidiabética, podemos destacar polissacarídeos, esteroides, flavonoides, glicosídeos, óleos, vitaminas, terpenóides e outros (Abdel-Hassan, Abdel-Barry e Tariq Mohammeda, 2000). Mais de 1200 espécies vegetais são listadas e usadas como antidiabéticas em todo o mundo (Patel *et al.*, 2012).

Apesar da diversificada flora brasileira e da comum utilização de plantas medicinais pela população, muitos estudos científicos investigando as propriedades terapêuticas de espécies vegetais nativas do Brasil ainda precisam ser realizados (Ivorra, Payá e Villar, 1989; Grover, Yadav e Vats, 2002; Dornas *et al.*, 2009).

1.7.3 *Salacia impressifolia*(Miers) C. Smith (*S. impressifolia*)

Popularmente reconhecida como miraruíra ou cipó- miraruíra, a espécie *S. impressifolia* está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais dos dois hemisférios e pouco representada nas zonas temperadas. No Brasil, é encontrada nos estados: Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Mato Grosso (Joly, 1993) (figura 4). A espécie *S. impressifolia* é pertencente ao gênero de uma das 300 famílias *Hippocrateaceae* e é facilmente reconhecida por apresentar cipó escandescente, com flores amareladas, botões esverdeados e fruto comestível e rugoso (Milward-De-Azevedo, Valente e Marquete 2006; Usp, 2014).

Estudos etnofarmacológicos indicam que as populações que vivem na região amazônica do Brasil utilizam no tratamento de diabetes, frequentemente, o caule na forma de infusão, sendo, inclusive comercializado o extrato bruto no comércio local e na *internet* (Amazon,

2014). Apesar da utilização da planta pela população, não existem estudos científicos comprovando os benefícios, até o momento.

Alguns estudos fitoquímicos da *S. impressifolia* apresentados em congressos brasileiros identificaram substâncias ativas, principalmente triterpenos (Costa *et al.*, 2007; S.R. Filho *et al.*, 2008). Estudos realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC permitiram a identificação de compostos triterpênicos, como: α -amirina, β -amirina, acetato de lupeol, β -amirenona e friedelan-3-ona (Ruani, 2014) (figura 5).

Figura 4- *Salacia impressifolia* (A) e *Croton heterodoxus* (B)

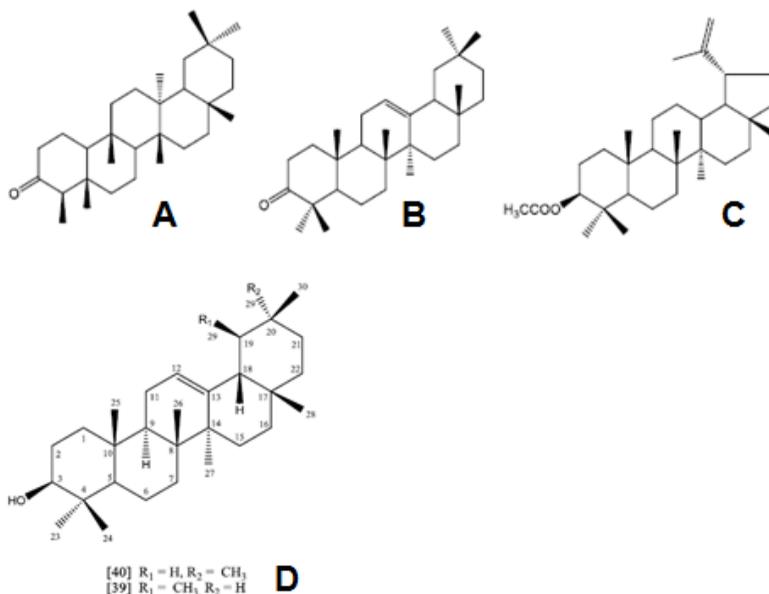
A



B



Fonte: A. USP (2014); B. UNESCO (Unesc, 2014)

Figura 5 – Estruturas triterpênicas isoladas da *S. impressifolia*

Friedelan-3-ona (A), β -amirenona (B), acetato de lupeol (C) α -amirina e β -amirina (D).

1.7.4 *Croton heterodoxus* (*C. heterodoxus*)

O gênero *Croton* pertence à família *Euphorbiaceae*, que compreende 1300 espécies. Em geral, a família é caracterizada por uma vegetação arbórea, arbustiva e herbácea e se distribui em zonas tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil. O *Croton* é um gênero promissor para futuras pesquisas em razão da diversidade química, sendo utilizado frequentemente na medicina popular (Govaerts, Frodin e Radcliffe-Smith, 2000; Zou *et al.*, 2010; Barreto *et al.*, 2013) (figura 4 B).

Algumas espécies de *Croton* já possuem estudos fitoquímicos e farmacológicos descritos na literatura que comprovam, a partir dos compostos isolados, a eficácia frente a algumas patologias, inclusive por meio de estudo com compostos isolados. Estudos descreveram ações

antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante, entre outros (Chen *et al.*, 2007; Rossi *et al.*, 2011).

Em relação a *C. heterodoxus*, trabalhos científicos identificaram substâncias, principalmente triterpenos. Não existem dados relatando o uso ou o nome popular desta planta para o tratamento de doenças. Estudos deste grupo de pesquisa já apontaram o efeito anti-hiperglicemiante de triterpenos isolado da planta em modelo animal de hiperglicemia induzido por sobrecarga de glicose (4 g/kg) (Castro *et al.*, 2014b; Castro *et al.*, 2015).

1.7.5 Terpenos

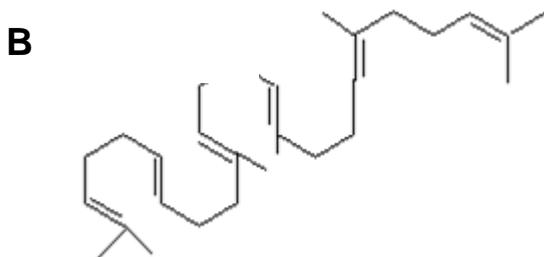
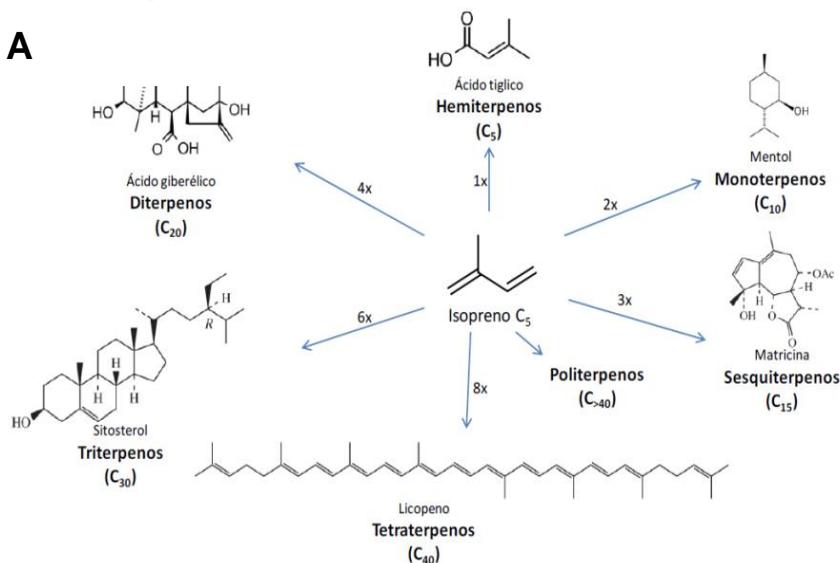
Terpenos (ou terpenóides) constituem uma classe de substâncias naturais com grande variedade estrutural e amplamente distribuída na natureza (Humphrey e Beale, 2006; Jager *et al.*, 2009). Estes compostos apresentam uma estrutura básica baseada em um número definido de isoprenos (metil-buta-1,3-dieno), possuindo 5 átomos de carbono, de fórmula química geral $(C_5H_8)_n$. As ligações das estruturas isoprênicas (cabeça-cauda) possibilitam a classificação dos diversos grupos de terpenos, de acordo com o número de isoprenos: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) e outros (Dewick, 2009) (figura 6 A).

Apesar do isopreno ser a unidade básica dos terpenos, esta não está envolvida na síntese da substância. A principal via de síntese dos terpenos é a via acetato/mevalonato. A rota de síntese dos isoprenóides consiste na organização do grupo isopreno, isopentenil difosfato pirofosfato (IPP) e do isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP) (Xu, Fazio e Matsuda, 2004; Misawa, 2011). A enzima preniltransferase condensa o DMAPP e o IPP gerando o geranildifosfato (GPP) contendo dez carbonos. O GPP, juntamente com o IPP, é convertido a farnesildifosfato (FPP) (15 carbonos), por ação da FPP sintase. O FPP é condensado ao IPP pela enzima GPP sintase formando geranilgeranil difosfato (GGPP) (20 carbonos). Dessa forma, o GPP, FPP e GGPP são precursores dos mono, sesqui e diterpenos. Duas moléculas de FPP são condensadas ao esqualeno (figura 6 B) que é precursor do triterpeno e esteróide (Misawa, 2011).

Assim, considerando os prováveis efeitos promissores com relação à atividade anti-hiperglicêmicas das plantas (*S. impressifolia* e *C. heterodoxus*) e dos terpenos, o estudo do mecanismo e ação desses compostos é promissor para o desenvolvimento de novas formas de tratamento e regulação da glicemia. O principal interesse no estudo de

terpenos para a DM reside no fato de que assim a forma ativa da vitamina D₃ – a 1,25(OH)₂vitamina D₃, o triterpeno apresenta a unidade esqualeno na estrutura . Além disso, é conhecido que alguns triterpenos apresentam efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante comprovado (Norman e Litwack, 1997; Lietzke *et al.*, 2000; Castro *et al.*, 2014a). Apoiado em estudos do grupo e em relatos da literatura, dos objetivos arrolados neste projeto, o diferencial inovador é o estudo do potencial ação anti-hiperglicêmica de compostos de novas plantas assim como triterpenos na regulação da homeostasia da glicose.

Figura 6- Exemplos de terpenóides e as respectivas classes (A). Estrura química do esqualeno (B)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009)

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o efeito e o mecanismo de ação do extrato bruto, frações e resíduo insolúvel do caule da *S. impressifolia*, das folhas da *C. heterodoxus* e de um novo triterpeno derivativo na homeostasia da glicose em modelos animais *in vivo* e *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das frações, resíduo insolúvel e extrato bruto do caule da *S. impressifolia* na glicemia de ratos hiperglicêmicos;
- Estudar o efeito *in vivo* do extrato bruto, frações e resíduo insolúvel do caule da *S. impressifolia* na atividade das dissacaridases intestinais (maltase e sacarase) em ratos;
- Avaliar o efeito antiglicativo *in vitro* do extrato bruto, resíduo insolúvel e frações do caule de *S. impressifolia*;
- Avaliar o efeito do extrato bruto da folha *C. heterodoxus* e de um triterpeno derivativo, na glicemia de ratos hiperglicêmicos;
- Estudar o efeito do triterpeno derivativo na concentração sérica de insulina de ratos hiperglicêmicos;
- Avaliar quali e quantitativamente o efeito do triterpeno derivativo na translocação de vesículas de insulina no pâncreas de ratos normoglicêmicos;
- Estudar o efeito *in vitro* do triterpeno derivativo na captação de $^{14}\text{C-DG}$ no pâncreas de ratos normoglicêmicos;
- Estudar o efeito e o mecanismo de ação *in vitro* do triterpeno derivativo no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no pâncreas de ratos normoglicêmicos;
- Estudar o efeito do triterpeno derivativo na concentração sérica de GLP-1 de ratos hiperglicêmicos;
- Estudar o efeito *in vitro* do triterpeno derivativo na atividade do DPP-IV de ratos hiperglicêmicos;
- Estudar o efeito e o mecanismo de ação *in vitro* do triterpeno derivativo no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal de ratos normoglicêmicos;
- Estudar o efeito *in vivo* do triterpeno derivativo na atividade das dissacaridases intestinais (maltase, lactase e sacarase) em ratos.

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAIS

Albumina bovina sérica (ABS), cloreto de esteroilcarnitina (ST), N-[2-(p-bromocianamylamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), nifedipina, 1,2-bis (2-aminofenoxi) etano-N,N,N₀, ácido 1,2-bis(2-aminofenoxi) etano-N,N,N',N'-tetraacético (acetoximetil ester) (BAPTA-AM), tolbutamida, apamina e diazoxide foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). Solventes para extração e isolamento, clorofórmio, acetato de etila, etanol, hexano e metanol foram adquiridos de LabSynth[®] (Diadema, SP, Brasil). Glicose e solventes foram adquiridos da Vetec Química[®] (Florianópolis, SC, Brasil). O kit de ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês enzyme linked immunosorbent assay) para determinação da insulina de rato (catálogo nº EZRMI-13K), GPL-1 (GLP-1 (7-36)) e de DPP -IV (Cayman Chemical[®]) e a água ultrapura foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q Plus foram adquiridos da Merck Millipore Corporation[®] (St. Charles, MO, Estados Unidos da América). [U-¹⁴C]-2-Desoxi-D-glicose (¹⁴C-DG), atividade específica 9,25 GBq/mmol, [⁴⁵Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺) e Optiphase Hisafe III líquido de cintilação biodegradável foi adquirido da Perkin-Elmer Life (Rowville, CL, Austrália)[®] e da Analytical Sciences[®] (Boston, MA, EUA).

A acetonitrila grau HPLC foi obtida comercialmente (Panreac[®], Barcelona, Espanha). Nos fracionamentos cromatográficos em coluna foi utilizada sílica gel (Carlo Erba) de granulometria 0,063:0,20 mm, poliamida CC6 Macherey-Nagel com tamanho de partícula menor que 0,07 mm e Sephadex LH-20. Para cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas de alumínio cobertas com uma camada de sílica gel de 0,2 mm de espessura. As placas de CCD foram reveladas por meio de luz ultravioleta com comprimentos de onda de 254 e 365 nm, exposição a vapores de iodo e/ou imersão em solução de anisaldeído sulfúrico, seguida de aquecimento a 110°C. Todos os produtos químicos foram analiticamente graduados.

3.2 PLANTAS: FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADOS

3.2.1 Obtenção e fracionamento do extrato bruto de *S. impressifolia*

O preparo dos extratos e frações do caule de *S. impressifolia* foram executados pela mestranda Ana Paula Ruani e colaboradores sob a orientação do Prof^o Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti do grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC (Ruani, 2014).

O extrato bruto hidroalcolólico de *S. impressifolia* foi obtido por maceração em etanol 96% do caule seco e pulverizado (2000 g), adquirido comercialmente (A REGIONAL®, Parintins, AM). O tempo de maceração foi de sete dias e o procedimento de extração foi repetido por três vezes. Os extratos obtidos foram reunidos, filtrados e o solvente evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida (50-60°C) rendendo 107 g de extrato bruto seco.

Uma alíquota de 102 g do extrato bruto seco foi submetida à extração sólido-líquido, sucessivamente, com clorofórmio e acetato de etila, rendendo 8,06 g de fração clorofórmio (Fr-CHCl₃O), 10,40 g da fração acetato de etila (Fr-AcOEt) e 70,39 g do resíduo insolúvel (RI). Alíquotas do extrato bruto seco, frações Fr-CHCl₃, Fr-AcOEt e RI foram reservadas para realização de ensaios para avaliação de suas potenciais atividades biológicas.

3.2.2 Preparação de extratos e frações de *C. heterodoxus*

O preparo do extrato bruto das folhas da *C. heterodoxus*, assim como os experimentos para o isolamento do triterpeno 1 (T1) e semi-síntese do triterpeno 2 (T2) foram executados pelo doutorando Leandro Espíndola e colaboradores do grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, sob orientação do Prof^o Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

A planta foi coletada em Abrigo Rio Pitangui (coordenadas UTM 593095 e 7231847), na região de Campos Gerais na cidade de Ponta Grossa, Paraná, nos meses de abril, junho e novembro de 2010 e 2011. A planta foi identificada pelo botânico Daniel Barcellos Falkenberg. Um *voucher* da espécie foi depositada no Herbário FLOR, UFSC e registrado sob o número 37689.

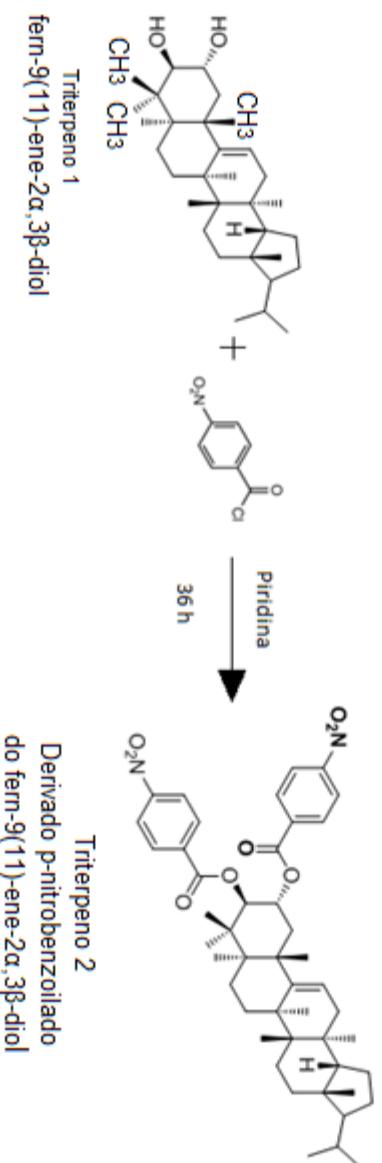
O caule e as folhas foram identificados e secos em forno com circulação de ar (50°C). Posteriormente, este material foi macerado em

etanol hidratado (96%) por 7 dias. O extrato obtido foi filtrado e o solvente foi evaporado em rotaevaporador a vácuo (60°C) até atingir 1/3 do volume inicial. Este procedimento foi realizado três vezes ao dia, durante uma semana, resultando no extrato bruto hidroalcoólico, que foi submetido a uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano e acetato de etila), resultando em três frações: hexano, acetato de etila e aquosa.

3.2.3 Isolamento do fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol

A fração de hexano (25 g) do extrato da *C. heterodoxus* foi submetida a fracionamento cromatográfico em coluna de gel de sílica, eluída com hexano/acetato de etila (0-100%), resultando em 155 frações de 125 mL cada. Frações 69 – 75 (30% de acetato de etila/hexanos) foram combinados e purificados por acetato de etila, resultando em 3,743mg de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol na forma de um sólido fino branco. A recristalização utilizando acetato de etila (30%) em hexano propiciou cristais incolores. HRMS (ESI) m/z [M+Na]⁺: calculado para C₃₀H₅₀O₂: 465.3703; encontrado: 465.3704; pf 167.3-172,8 °C; CCD Rf 0,46 (40 % de acetato de etila em hexanos); IV (KBr) Amax cm⁻¹ 3557, 3395, 2949, 2867, 1642, 1471, 1454, 1379, 1054. RNM ¹H (CDCl₃, ppm) δ 2,25 (dd, J = 12,50 Hz e 4,30 Hz); 1,22 (m, H-1); 3,69 (m, J = 11,87 hz, 9,31 Hz e 4,37 Hz, H-2); 3,01 (d, J = 9,37 Hz H-3); 1,35 (m, H-5); 0,79 (m, H-6); 1,63 (m, H-7); 2,08 (d, J = 11,32 Hz, H-8); 5,35 (dd, J = 5,27 Hz e 2,73 Hz, H-11); 1,64 (m); 1,41 (m, H-12); 1,29 (m, H-15); 1,66 (m, H-16); 1,54 (m, H-18); 1,25 (m, H-19); 1,05 (m, H-20); 0,98 (d, J = 9,57 Hz, H-21); 1,44 (m, H-22); 1,01 (s, H-23); 0,91 (s, H-24); 1,14 (s, H-25); 0,74 (s, H-26); 0,81 (s, H-27); 0,76 (s, H-28); 0,84 (d, J = 6,64 Hz, H-29); 0,89 (d, J = 6,44, H-30), NMR ¹³C (CDCl₃, ppm) δ 47,2 (C-1); 69,2 (C-2); 83,5 (C-3); 39,2 (C-4); 44,3 (C-5); 17,7 (C-6); 18,9 (C-7); 39,8 (C-8); 150,1 (C-9); 39,0 (C-10); 116,6 (C-11); 36,6 (C-12); 36,7 (C-13); 37,6 (C-14); 29,2 (C-15); 36,1 (C-16); 42,9 (C-17); 51,9 (C-18); 20,1 (C-19); 28,2 (C-20); 59,6 (C-21); 30,7 (C-22); 27,9 (C-23); 16,2 (C-24); 26,1 (C-25); 15,3 (C-26); 15,8 (C-27); 13,9 (C-28); 23,0 (C-29); 22,1 (C-30). No presente estudo, o composto natural isolado foi denominado triterpeno 1 (T1).

Figura 7 - Reação de modificação estrutural



3.2.4 Síntese do triterpeno derivativo (T2)

Um balão de dois pescoços de fundo redondo equipado a um condensador, por sua vez equipado com septo de silicone com entrada para injeção de nitrogênio no topo foi carregada com o triterpeno natural 1 (0,300 g; 0,68 mmol, 1 equiv), p-nitrobenzoila (0,502 g, 2,71 mg, 4 equiv) e piridina (25 mL).

A reação foi conduzida com nitrogênio por 36 horas. Diclorometano (30 mL) foi adicionado e a fase orgânica foi lavada com três porções de 25 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) aquoso 2M, três porções de solução bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 10%, posteriormente foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) filtrado e concentrado para obter 0,421 g de um óleo amarelo pálido purificado com coluna cromatográfica sílica gel (30g) com eluição isocrática com hexano-EtOAc 70-30% que proporcionou 0,151g (31 %) de triterpeno derivativo 2 na forma de um sólido amarelo pálido: pf 80 – 81 °C. RNM ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ8,12 (m, 8 H), 5,53 (m, 1H), 5,20 (d, 1H, *J* = 10.26), 0,50 – 1,65) (figura 7).

RNM ¹H (CDCl₃, ppm), NMR ¹³C (CDCl₃, ppm), HMQC, HMBC estão resumidos no apêndice (dados obtidos por COSY, HMQC e HMBC).

3.3 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (180-200 g) foram mantidos em caixas plásticas com temperatura controlada (aproximadamente 21 ± 2°C) com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas entre 6 e 18 h). Os animais receberam alimento (Nuvital, Nuvilab CR1, Curitiba, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Animais em jejum foram privados de alimento por 16 h, sendo permitido acesso à água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) local (Protocolo CEUA-UFSC PP00398).

Figura 8 - Tratamento *in vivo* de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 1) (n=8)

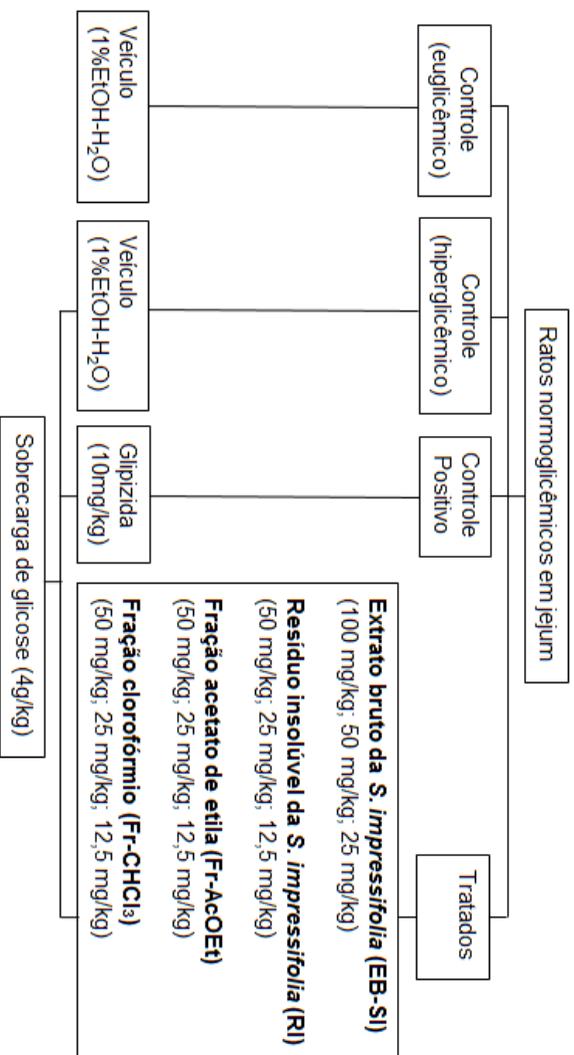


Figura 9 - Tratamento *in vivo* de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 2) (n=8)

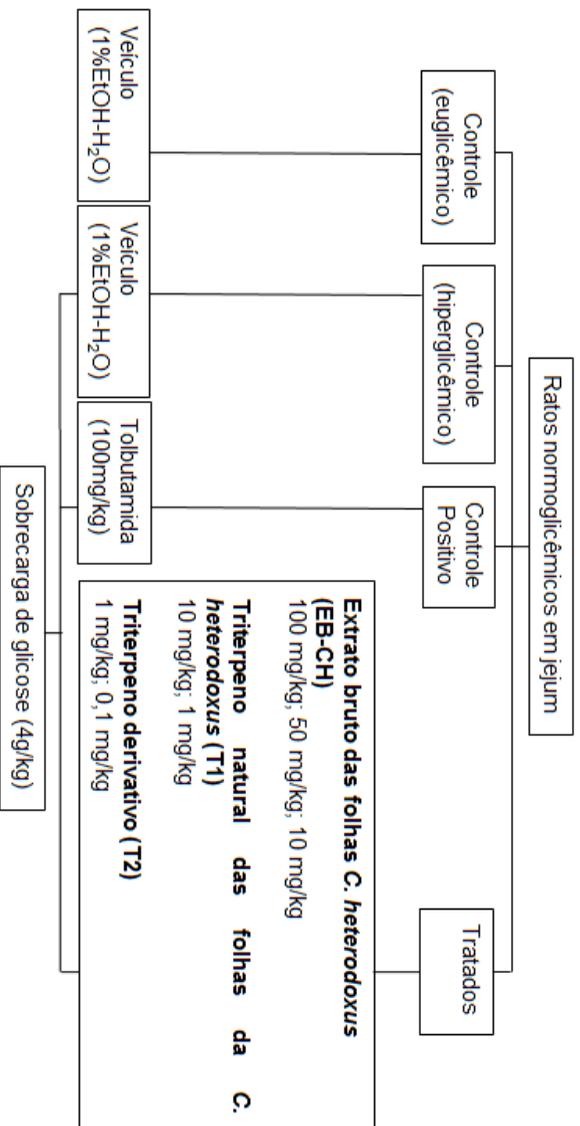
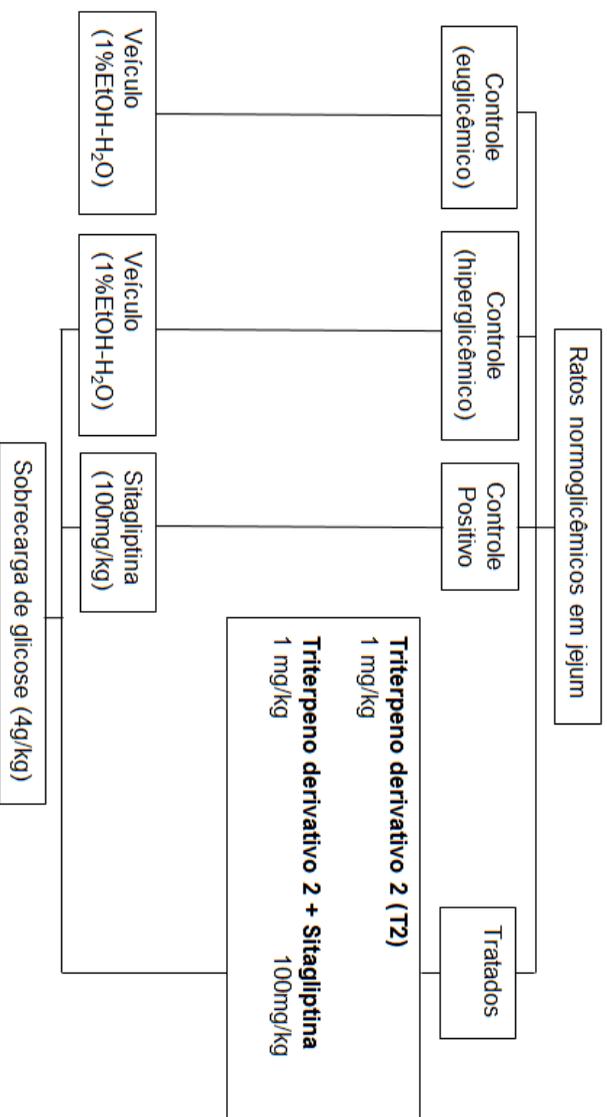


Figura 10 - Tratamento *in vivo* de ratos submetidos à curva de tolerância à glicose (parte 3) (n=8)

3.4 CURVA DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Neste estudo, foi utilizado um modelo animal de hiperglicemia aguda amplamente utilizada com sucesso neste grupo de pesquisa (Cazarolli *et al.*, 2009; Frederico *et al.*, 2012). A hiperglicemia foi induzida por meio de dose única de glicose intraesofágica (4 g/kg; 8,9 M) em todos os grupos, exceto no grupo controle (euglicêmico), que recebeu apenas o veículo etanol 1% (diluído em água destilada). Os tratamentos foram administrados 30 min antes da indução da hiperglicemia, conforme descrito nas figuras 8, 9 e 10, referentes às partes 1, 2 e 3 deste estudo, respectivamente. Todos os tratamentos foram administrados por via intraesofágica (gavagem).

A glicemia foi medida antes do início do tratamento (tempo zero) e 15, 30, 60 e 180 min após sobrecarga de glicose pelo método glicose oxidase de acordo com as recomendações do fabricante (Varley, Gowenlock e Bell, 1976; De Sousa *et al.*, 2004). Os resultados foram expressos em miligrama de glicose por decilitro de soro (mg/dL).

3.5 INSULINA SÉRICA

As concentrações de insulina foram mensuradas antes do início do tratamento (tempo zero). Imediatamente, ratos receberam o tratamento e após 30 min a glicose foi administrada. Todos os tratamentos foram administrados por via intraesofágica (gavagem). A concentração sérica de insulina foi avaliada nos tempos 15, 30 e 60 min por ensaio imunoenzimáticos (ELISA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram detectados valores de 0,2 a 10 ng/mL. O coeficiente de variação (CV) intra e inter ensaios foi 3,22 e 6,95, respectivamente, com sensibilidade de 0,2-10 ng/mL. A insulina foi avaliada por colorimetria (450 nm) com leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, USA) por interpolação da curva padrão (Cazarolli *et al.*, 2009). Amostras de sangue dos animais foram analisadas em duplicata e resultados foram expressos como nanograma de insulina sérica por mililitro (ng/mL) (Damazio *et al.*, 2010).

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS DISSACARIDASES INTESTINAIS *IN VIVO*

Os ratos hiperglicêmicos foram tratados de acordo com as figuras 8 e 9. Um segmento do intestino delgado (duodeno) foi removido, lavado em 0,9% de solução de cloreto de sódio (NaCl), secado sobre

papel filtro, pesado, cortado, homogeneizado com NaCl a 0,9% (400 mg/mL) e centrifugado 18000 rotações por minuto (8 min). O sobrenadante foi incubado a 37 °C durante 5 min com o substrato (maltose ou sacarose) em tampão maleato (pH 6,0). Atividades da maltase e sacarase foram determinadas pelo método glicose oxidase de acordo com as recomendações do fabricante (Pereira *et al.*, 2012a). A atividade específica foi definida como a atividade da enzima por miligrama de proteína (U/mg, corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto) (Dahlqvist, 1984). A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina sérica como padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos, juntamente com os controles apropriados.

3.7 CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLP-1 E DPP-IV *IN VITRO*

Os ratos foram tratados de acordo com a figura 10. As concentrações de GLP-1 foram mensuradas antes do início do tratamento (tempo zero). Imediatamente, ratos receberam o tratamento (triterpeno 2 ou sitagliptina) e após 30 min a glicose foi administrada. Todos os tratamentos foram administrados por via intra-esofágica. As concentrações plasmáticas de GLP-1 (GLP-1(7-36)) foram avaliadas aos 15, 30 e 60 min e medido pelo método de ELISA de acordo com as recomendações do fabricante. Os resultados foram expressos em miligrama de GLP-1 por decilitro (mg/dL).

A ação do triterpeno 2 (1 nM) na atividade da DPP-IV foi avaliada *in vitro* com o kit Cayman Chemical (Michigan, EUA), e medido por ELISA de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8 ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

O pâncreas de ratos euglicêmicos foi visualizado por meio de uma incisão abdominal central. O ducto pancreático foi obstruído na altura do duodeno e canulado próximo ao fígado. A solução de Krebs Ringer (KRb-HEPES), cuja composição é: NaCl (122 milimolar (mM)), KCl (3 mM), MgSO₄ (1,2 mM), CaCl₂ (1,3 mM), KH₂PO₄ (0,4 mM), e NaHCO₃ (25 mM), carbogenado com O₂/CO₂ (95%:5%, v/v) até pH 7,4) adicionado de HEPES (8 mM), glicose (3 mM) foi inserido cuidadosamente no ducto pancreático, com uma seringa, até o pâncreas estar suficientemente distendido (inflado). O pâncreas foi removido e

mantido numa placa de Petri com solução de KRB-HEPES. O tecido pancreático foi cortado em pequenos pedaços (2 x 2 mm) e incubado em tubos cônicos em 1 mL de solução de KRB-HEPES adicionado de colagenase (3 mg). Após a incubação a mistura foi transferida para tubos cônicos (110x15 mm), resuspendido em 10 mL sem colagenase e centrifugado (centrifuga Excelsa Baby, modelo 206, FANEM, São Paulo, SP, Brazil) por 3 min, 45 giros. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso em 10 mL de solução de KRB-HEPES. Este processo foi repetido 5 vezes. Alíquotas (100 µL) de ilhotas isoladas foram transferidas para microtubos contendo 300 µL de solução de KRB-HEPES (Lacy e Kostianovsky, 1967; Grillo *et al.*, 2005).

3.9 CAPTAÇÃO DE GLICOSE (^{14}C -DG) NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS DE RATOS

As ilhotas isoladas de ratos euglicêmicos foram pré-incubadas (30 min) e incubada (tempo de tratamento de 60 min) em solução de Krebs Ringer bicarbonato (KRB) cuja composição é: glicose (5,6 mM), NaCl (122 mM), KCl (3 mM), MgSO_4 (1,2 mM), CaCl_2 (1,3 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM), e NaHCO_3 (25 mM), ambiente com concentração O_2/CO_2 (95%:5%, v/v) e pH 7,4. C-DG (0,1 micro Curie (μCi)/mL) (Cazarolli *et al.*, 2009; Frederico *et al.*, 2012).

O tratamento triterpeno 2 derivativo (T2) ou tampão KRB para o grupo controle e o análogo da glicose não metabolizável, ^{14}C -DG (0,1 μCi /mL), foram incubados nas amostra de ilhotas pancreáticas durante o período de incubação. Após a incubação, as ilhotas foram homogeneizadas em NaOH (0,5 N) e fervidas por 10 min. 25 µL de alíquotas do tecido foram adicionadas ao microtubo contendo 1 mL de líquido de cintilação. As amostras foram processadas como descrito por Cazarolli *et al.* (2009). A leitura da radioatividade foi realizada no cintilador (modelo 1215; EG e G-Wallac, Turku, Finlândia). 5µL de cada amostra foram utilizado para a quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951). A captação de glicose foi expressa como nmol de unidade de glicose por miligrama de proteínas (nmol un. de glicose/mg de proteína).

3.10 INFLUXO DE $^{45}\text{CA}^{2+}$ NAS ILHOTAS PANCREÁTICAS ISOLADAS E CÓLON INTESTINAL DE RATOS

As ilhotas pancreáticas ou as fatias de cólon intestinal de ratos euglicêmicos foram incubadas (60 min) num incubador com agitação do

tipo Dubnoff a 37°C com tampão de KRB-HEPES contendo glicose (5 mM) e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$), pH 7,4 em ambiente com concentração O₂:CO₂(95:5; v/v). Na sequência, as ilhotas ou fatias de cólon foram incubadas por 10 min em KRB-HEPES sem (controle) ou com triterpeno 2.

Em alguns experimentos, agonistas/antagonistas de canais iônicos ou cinases foram adicionados durante os 15 minutos anteriores a adição do tratamento e mantido em incubação durante todo período. Neste protocolo, foram utilizados: tolbutamida (300 μM), glibenclamida (300 μM) diazoxide (250 μM), apamina (1 μM), nifedipina (1 μM), BAPTA-AM (50 μM), ST (1 μM) ou H-89 (10 μM) (Batra e Sjögren, 1983; Grillo *et al.*, 2005; Zanatta *et al.*, 2011; Rosso *et al.*, 2012). Uma solução contendo cloreto de lantânio (10 mM) a 2°C foi adicionada as amostras para interromper o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados por 1 min a 45 giros, o sobrenadante foi descartado e as ilhotas foram lavadas 2 vezes com a mesma solução. As ilhotas foram homogeneizadas em solução com 300 μL NaOH (0,5 N) e fervidas (100°C) por 5 min. A leitura da radioatividade foi realizada no cintilador (modelo 1215; EG e G-Wallac, Turku, Finlândia). Para amostra foram utilizado 5 μL para a quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951). O influxo de cálcio foi expresso pmol de $^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{mg}$ de proteína.

3.11 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Para observação na MET, porções de pâncreas de rato foram incubados na presença de triterpeno 2 (1 nM) durante 5 ou 20 min. Após, foram fixados por 12 h em solução de glutaraldeído (2,5%), sacarose (2%) tamponadas com cacodilato de sódio (0,1 M) (pH 7,2) (Schmidt *et al.*, 2009). O material foi fixado com tetróxido de ósmio (1%) por 4 h e desidratado em séries de solução aquosa com concentrações crescentes de acetona. Após a desidratação, o material foi infiltrado com resina Spurr. Em seguida, as fatias ultrafinas foram contrastadas em acetato de uranila aquoso seguido por citrato de chumbo de acordo com Reynolds (1963). Quatro réplicas foram preparadas para cada grupo experimental; duas amostras por repetição foram examinados na MET (Jeol JEM1011 a 80 kV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME, UFSC, Brasil). Foi avaliada a quantidade de vesículas citoplasmáticas de insulina por células β (foram avaliadas 30 células) (Annerén, Welsh e Jansson, 2007; Castro *et al.* 2015).

3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-GLICAÇÃO DE *S. IMPRESSIFOLIA* IN VITRO

AGEs foram formados num sistema *in vitro*, conforme descrito Kiho et al. (2004) e adaptado por Pereira et al. (2012b). A glicose (500 mM) ou a frutose (300 mM) foram incubadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4; azida de sódio 0,02%) com ABS (10 mg/mL) na ausência (controle) ou na presença dos tratamentos (figura 11). A fluorescência emitida por AGEs foi medida com o fluorímetro Infinity M200 (TECAN) (excitação = 370 nm e emissão = 440 nm) antes do início da incubação (dia zero). Imediatamente, a solução anterior foi mantida em estufa, isolada da luz, a 37°C. A fluorescência foi medida no 7º, 14º e 28º dia (n = 5).

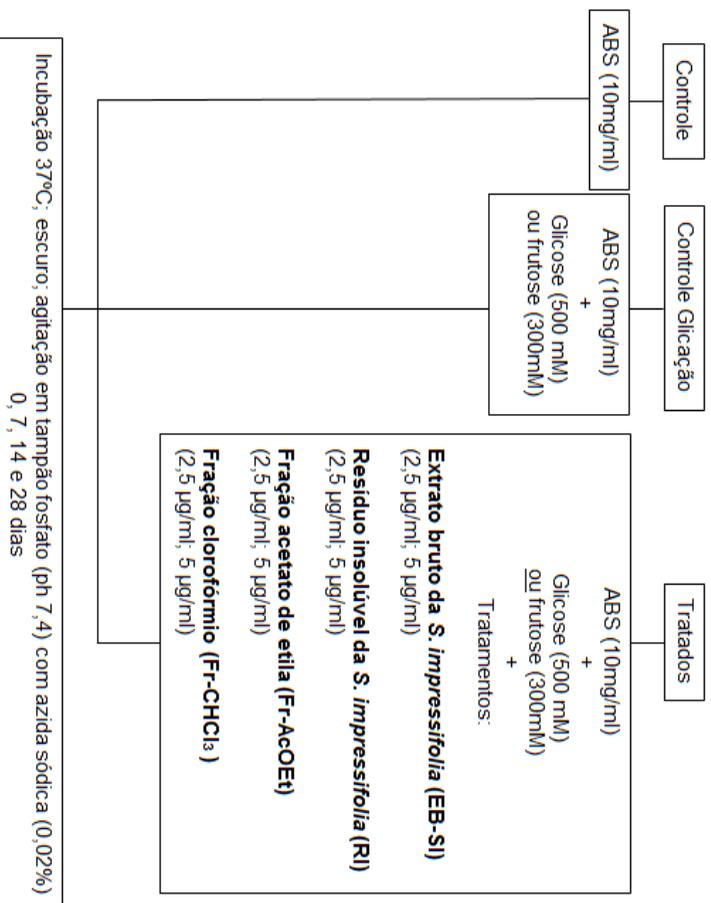
3.13 LACTATO DESIDROGENASE (LDH) SÉRICA

A atividade da LDH foi determinada após 180 minutos do tratamento intraesofágico com T1 e T2 (10 e 1 mg/kg, respectivamente). Amostras de soro foram utilizadas para determinar a atividade da LDH extracelular (Zanatta *et al.*, 2011).

3.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificadas. As comparações estatísticas foram realizadas através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni pelo programa INSTAT versão 2.2. Também foi utilizado para avaliação de parte das amostras o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para $p \leq 0,05$.

Figura 11 - Fluxograma dos tratamentos *in vitro* para determinação da atividade anti-glicação da *S. impressifolia*



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados que fazem parte desta tese de doutorado estão apresentados em três partes com o objetivo de facilitar a compreensão e sequência dos resultados obtidos nos diferentes temas estudados.

Parte 1: Potencial ação anti-hiperglicêmica/hipoglicemiante do EB-SI e frações do caule da *S. impressifolia*.

Parte 2: Potencial ação anti-hiperglicêmica de um triterpeno derivativo (T2).

Parte 3: Ação do triterpeno derivativo (T2) no intestino.

4.1 PARTE 1: POTENCIAL AÇÃO ANTI-HIPERGLICÊMICA/HIPOGLICEMIANTE DO EB-SI E FRAÇÕES DO CAULE DA *S. IMPRESSIFOLIA*

4.1.1 Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na curva de tolerância à glicose

A

Tabela mostra os dados relativos à curva de tolerância à glicose em ratos tratados com diferentes doses de extrato bruto e frações em tempos específicos (0 a 180 min). Ratos que receberam a sobrecarga de glicose apresentaram clássico aumento da curva glicêmica nos tempos 15, 30 e 60 min quando comparado ao tempo zero do mesmo grupo (hiperglicêmico/hiper). Por outro lado, ratos tratados com EB-SI (doses de 25, 50 e 100 mg/kg) apresentaram concentração de glicemia significativamente menores quando comparado ao grupo hiperglicêmico. A dose de 50 mg/kg determinou efeitos mais expressivos (redução de aproximadamente 12%, 20% e 10%, nos respectivos tempos 15, 30 e 60 min), por isso foi selecionada para iniciar os estudos com as frações e RI. A figura 12 mostra o efeito comparativo dos quatro tratamentos na dose de 50 mg/kg. Adicionalmente, a RI produziu significativo efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante nos tempos de 15 a 60 min, sendo a redução máxima observada de 33% aos 15 min (dose 25 mg/kg). Já, os ratos tratados com a Fr-CHCl₃O apresentaram redução significativa da glicemia nos tempos 15, 30 e 60 min e a redução máxima observada foi de 36% aos 30 min (dose 12,5 mg/kg). A Fr-AcOEt não produziu alterações na curva glicêmica neste modelo animal de hiperglicemia. Além disso, o tratamento controle positivo com glipizida (10 mg/kg) produziu o típico efeito em diminuir a concentração sérica de glicose nos tempos de 15 a 60 min comparado ao grupo hiperglicêmico. O grupo controle euglicêmico (recebeu veículo 1% EtOH-H₂O) não apresentou alterações significativas no perfil de glicemia no período estudado. Em conjunto, estes dados demonstram a potencial ação anti-hiperglicêmica da *S. impressifolia*.

Tabela 1 - Efeito agudo do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na glicemia (mg/dL) na curva de tolerância à glicose

Concentração sérica de glicose (mg/dL)						
Grupo	Dose (mg/kg)	Tempo (min)				
		0	15	30	60	180
I Controle	Veículo	103±3	105±7	124±4	110±7	105±2
II Hiper	Veículo	101±3	168±1 ^{##}	182±1 ^{###}	160±4 [#]	127±4
III Hiper+ EB-SI	100	106±3	158±9	144±9 ^{**}	144±9 [*]	112±9
	50	109±2	147±7 ^{**}	146±6 ^{**}	144±8 [*]	124±2
	25	101±2	159±9	170±4	126±5 ^{***}	124±5
IV Hiper+ RI	50	109±3	113±9 ^{***}	127±3 ^{***}	120±2 ^{***}	122±4
	25	87±3	112±5 ^{***}	127±4 ^{***}	122±4 ^{***}	129±7
	12,5	97±2	128±5 ^{**}	126±4 ^{***}	133±2 ^{**}	132±4
V Hiper+Fr -AcOEt	50	88±2	159±8	168±9	157±9	133±3
	25	97±5	156±9	174±9	168±9	133±5
	12,5	96±3	160±6	160±6	158±9	135±4
VI Hiper+ Fr-CHCl ₃ O	50	96±3	146±7 ^{**}	117±7 ^{***}	122±3 ^{***}	138±3
	25	114±3	149±4	156±3	141±3 ^{**}	127±4
	12,5	101±4	142±9 ^{**}	149±9 [*]	137±7 ^{**}	122±5

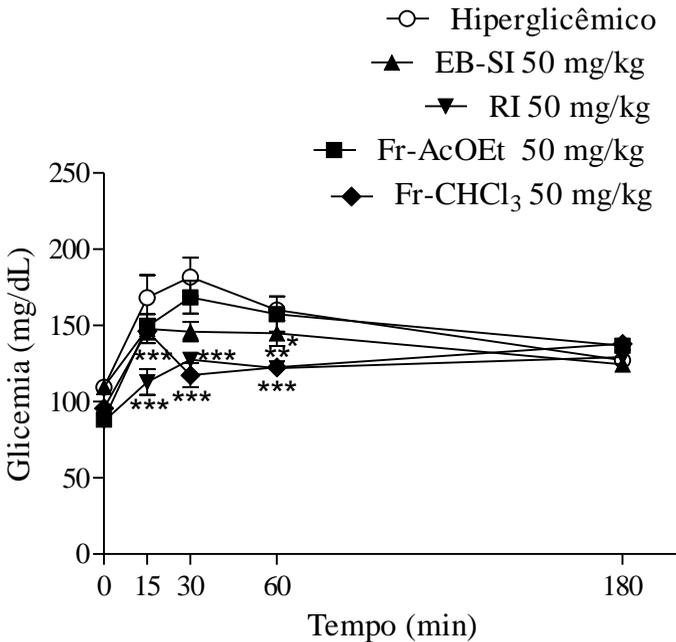
(Continua)

(Continuação da tabela 1)

Grupo	Dose (mg/ kg)	Tempo (min)				
		0	15	30	60	180
VII Hiper+ Glipizida	10	110±5	140±3**	127±4***	116±7***	115±4

Valores são expressos como média ±S.E.M; n=8. ### $p \leq 0.001$, ## $p \leq 0.01$, # $p \leq 0.01$ comparado ao grupo Controle. *** $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,01$ comparado ao grupo Hiperglicêmico.

Figura 12– Comparação do efeito agudo do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na glicemia na curva de tolerância a glicose

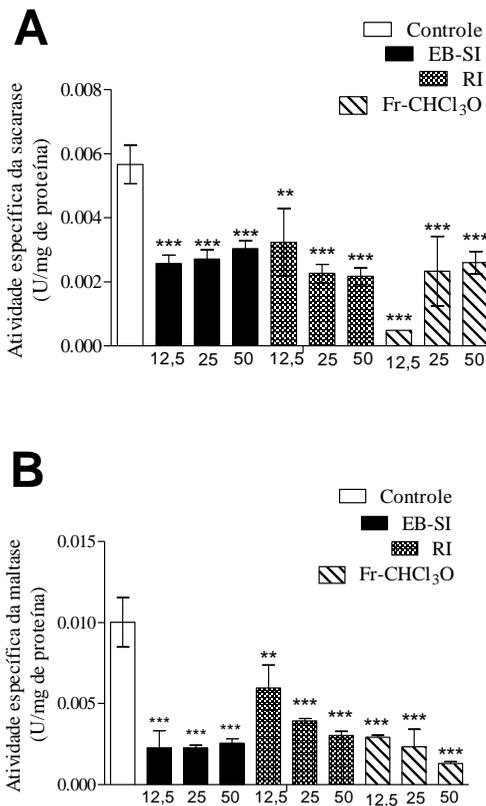


Valores são expressos como média ±E.P.M.; n=8 para cada tratamento. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo Hiperglicêmico.

4.1.2 Efeito do EB-SI, RI e Fr-CHCl₃O nas dissacaridases

A figura 13 ilustra a atividade específica das enzimas sacarase e maltase no duodeno de ratos após o tratamento *in vivo* com EB-SI, RI e Fr-CHCl₃O (doses de 12,5; 25 e 50 mg/kg). Os grupos tratados apresentaram diminuição acentuada na atividade das enzimas (maltase e sacarase) em comparação ao grupo controle.

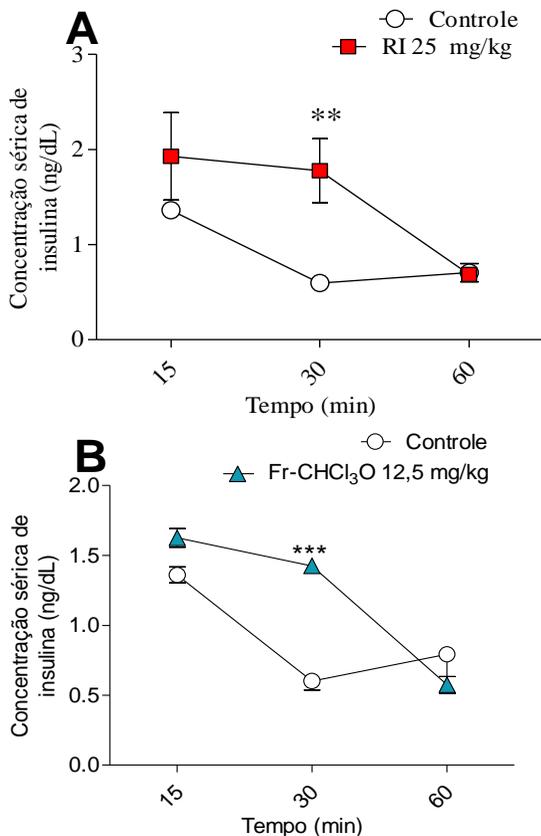
Figura 13- Atividade específica das enzimas sacarase e maltase no duodeno de ratos



Valores são expressos como média \pm S.E.M; n=6 em duplicata para cada tratamento. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

4.1.3 Efeito do RI e Fr-CHCl₃O na concentração de insulina sérica

Figura 14 - Efeito agudo de RI e Fr-CHCl₃O na concentração de insulina (ng/mL) na curva de tolerância a glicose



Valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6 em duplicata para cada tratamento. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; comparado ao grupo controle. Estatisticamente diferente do grupo controle hiperglicêmico.

A figura 14 mostra um padrão característico da secreção de insulina após sobrecarga de glicose (4 g/kg) no grupo controle

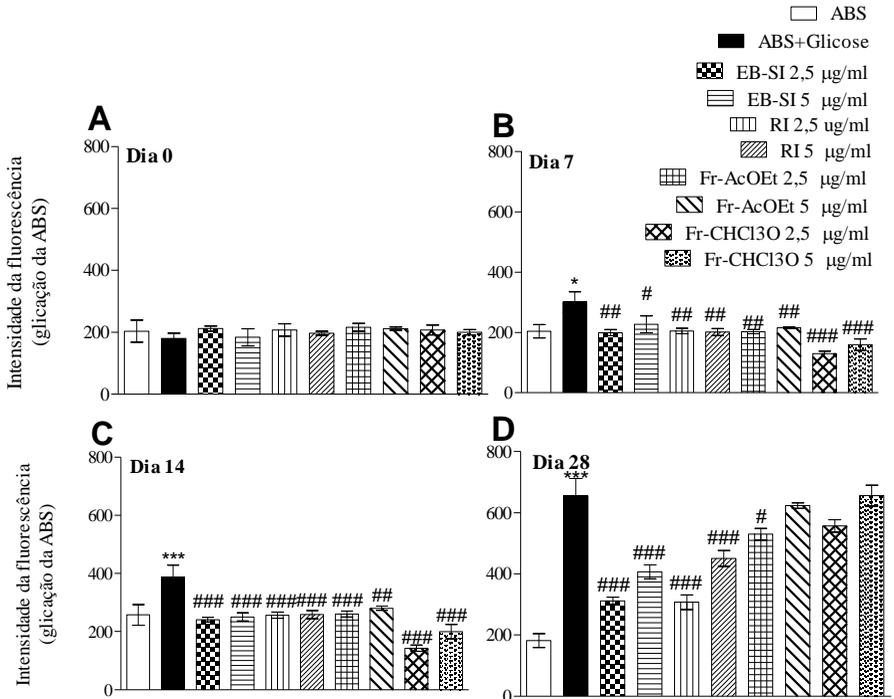
hiperglicêmico. Os grupos tratados com RI (A) e Fr-CHCl₃O (B) exibiram significativo efeito estimulatório na secreção de insulina.

4.1.4 Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na glicação de albumina *in vitro*

As figuras 15 e 16 (A a D) mostram a intensidade da fluorescência produzida por AGEs formados no modelo de glicação de albumina quando incubada com glicose ou frutose, respectivamente. Após a incubação, em todo período analisado (7^o, 14^o e 28^o dia) foi observado claramente que a formação de AGEs foi significativamente aumentada nos grupos BSA/glicose e BSA/frutose quando comparado ao grupo BSA.

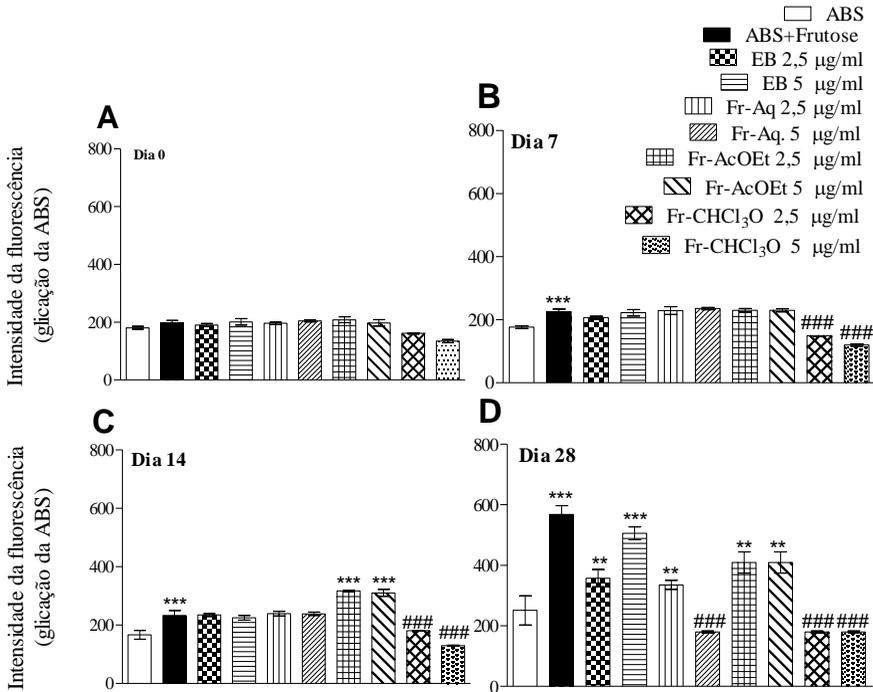
A figura 15 (A-D) demonstra, a eficiência do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na inibição da glicação da albumina com a glicose no período entre 7 e 28 dias. O efeito foi mais pronunciado no 14^o dia, quando o tratamento produziu diminuição de até 63% no grupo Fr-CHCl₃O 2,5 µg/mL. A figura 16 (A-D) apresenta, respectivamente o efeito do EB, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na glicação da albumina após incubação com frutose. A Fr-CHCl₃O produziu efeitos significativamente positivos no 7^o e 14^o dia. O EB-SI, RI e Fr-AcOEt demonstraram efeito até o 28^o dia. Conjuntamente, estes resultados demonstram a significativa capacidade do EB e frações da *S. impressifolia* em reduzir a formação de AGEs.

Figura 15- Efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na formação de fluorescência por AGEs no modelo ABS/glicose



Valores são expressos como média \pm S.E.M; n=6 em duplicata para cada tratamento. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo ABS. # $p \leq 0,05$; ## $p \leq 0,01$; ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo ABS+glicose.

Figura 16- Efeito do EB, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O na formação de fluorescência por AGEs no modelo ABS/frutose



Valores são expressos como média \pm E.P.M.; n=6 em duplicata para cada tratamento. *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo ABS. ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo ABS+frutose.

4.1.5 Discussão

A prevalência da DM aumentou progressivamente nas últimas décadas e o desenvolvimento de complicações associadas contribuem significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade em todo mundo. A fisiopatologia da DM é complexa e envolve, entre diversos fatores, defeitos na secreção e ação da insulina (Wild *et al.*, 2004). Apesar do grande interesse no desenvolvimento de novas formas de tratamento da DM e complicações tardias e do crescente interesse da comunidade científica no estudo de produtos naturais, apenas uma discreta parte das espécies de plantas tem os efeitos biológicos cientificamente comprovados (Grover, Yadav e Vats, 2002).

Algumas espécies de plantas utilizadas culturalmente pela população no tratamento da DM tiveram a eficácia comprovada por meio de estudos científicos. Além disso, o perfil fitoquímico e mecanismos de ação de algumas plantas (extratos, frações enriquecidas ou compostos isolados) foram elucidados (Cazarolli *et al.*, 2008; Bhat *et al.*, 2012). Plantas ricas em flavonoides e triterpenos podem atuar por meio do transporte e metabolismo da glicose nos tecidos periféricos, pela indução da secreção de insulina pelas células β do pâncreas ou ainda, na absorção intestinal de carboidratos (Zanatta *et al.*, 2008; Cazarolli *et al.*, 2009; Pereira, *et al.*, 2012a).

Devido à utilização popular da *S. impressifolia* no tratamento da DM, porém sem comprovação científica, um dos objetivos deste trabalho foi estudar o efeito do EB-SI, RI, Fr-AcOEt e Fr-CHCl₃O da *S. impressifolia* no modelo animal de hiperglicemia. O presente trabalho é o primeiro na literatura, até onde temos conhecimento, demonstrando que tanto o extrato bruto (EB-SI), quanto a fração (Fr-CHCl₃O) e o resíduo insolúvel (RI) reduziram significativamente a glicemia. Estes resultados comprovam a hipótese inicial deste estudo em relação ao efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante descrito para esta *S. impressifolia*.

Outras plantas com potencial atividade anti-hiperglicêmica e secretagogas de insulina já foram estudadas por este grupo de pesquisa. Trabalhos com *Baccharis articulata* (Kappel *et al.*, 2012), *Avehrrhoa carambola* (Cazarolli *et al.*, 2012) e *Musa paradisíaca* (Kappel *et al.*, 2014) demonstraram que os extratos, frações e compostos isolados das plantas apresentaram efeito anti-hiperglicêmico. Os efeitos observados na glicemia parecem envolver o estímulo da secreção de insulina das células β , bem como a atividade insulino-mimética de determinado componente dos extratos ou ainda uma associação de ambos.

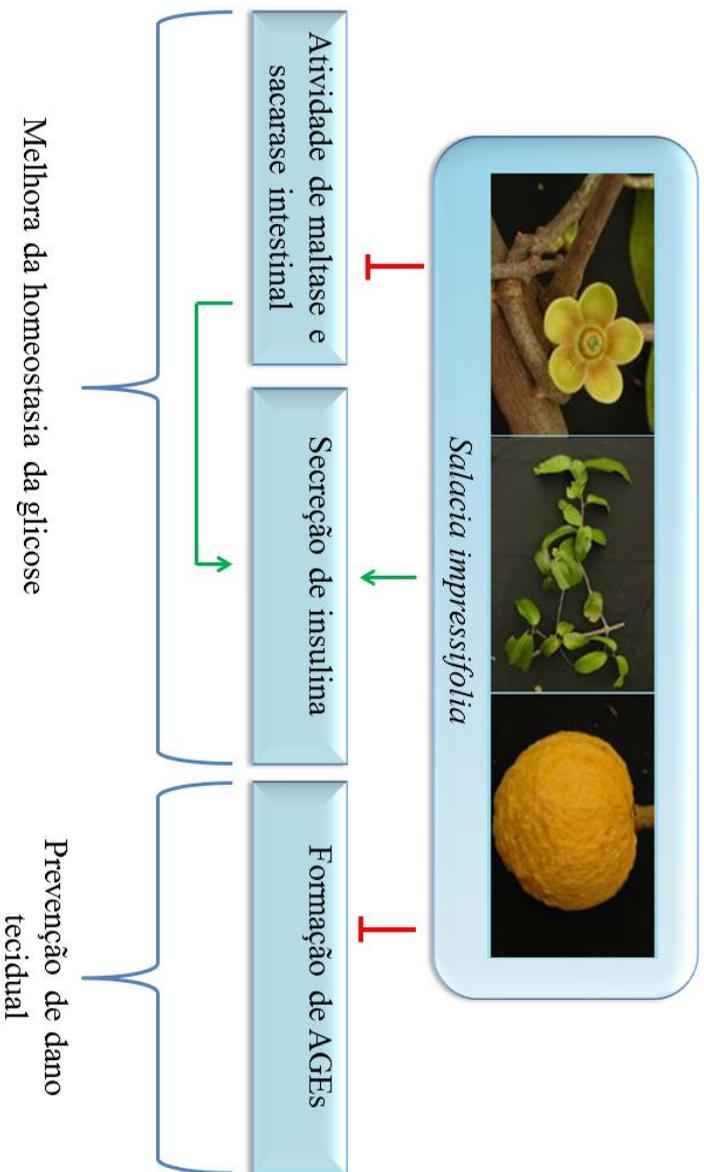
Inúmeros mecanismos foram descritos para explicar o potencial efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante de extratos, frações e/ou compostos isolados de plantas. A literatura aponta que algumas espécies exibem propriedades similares aos fármacos pertencentes à classe das sulfoniluréias, como glibenclamida, tolbutamida e glipizida, em que o efeito hipoglicêmico ocorre pelo estímulo da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Folador *et al.*, 2010). O modelo utilizado no presente estudo reflete com habilidade um quadro de hiperglicemia, muito comum em pacientes com DM, utilizando ratos não diabéticos (sem alterações pancreáticas e com a secreção de insulina preservada). Neste trabalho, foi avaliado o efeito de Fr- CHCl_3O e RI na concentração sérica de insulina. De modo interessante, os resultados apontam que ambos os tratamentos promoveram aumento na concentração de insulina aos 30 minutos. Diante disso, é possível que o efeito hipoglicemiante da *S. impressifolia* esteja relacionado a mecanismos que envolvam o aumento da secreção de insulina, ou seja, que a planta tenha um efeito secretagogo.

Ainda, algumas espécies de plantas também atuam inibindo α -glicosidases, enzimas que regulam a absorção de glicose no intestino (Andrade-Cetto, Becerra-Jimenez e Cardenas-Vazquez, 2008; Subramanian, Asmawi e Sadikun, 2008). A atividade das α -glicosidases no intestino aumenta a digestão dos açúcares e a absorção de glicose, colaborando para a hiperglicemia pós-prandial. Diante disso, a inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase é uma maneira efetiva de prevenir a hiperglicemia, a exemplo do mecanismo de ação do fármaco acarbose (Fowler, 2007). Desta forma, foram realizados também experimentos *in vivo* para verificar o efeito de EB-SI, RI e Fr- CHCl_3O da *S. impressifolia* frente à atividade das dissacarídeos. Foi observado que os tratamentos inibiram significativamente a atividade da maltase e sacarase. Coletivamente, estes dados apontam que o efeito anti-hiperglicêmico da *S. impressifolia* é devido, pelo menos em parte, à inibição destas enzimas.

No quadro de hiperglicemia prolongado altas concentrações dos AGEs são formados, que por sua vez, podem interagir com proteínas, como hemoglobinas. A glicação de proteínas interfere na função celular e causa alterações em vários tecidos. Além disso, a ligação dos AGEs em receptores específicos (RAGEs) pode levar à alteração na sinalização celular e estimular a produção de radicais livres. Os AGEs contribuem de modo relevante para as complicações vasculares na DM, representando um alvo promissor para medidas terapêuticas (Goh e Cooper, 2008). Diversos agentes naturais e sintéticos com possíveis

propriedades anti-AGE são estudados. Entre estes podemos destacar aqueles com capacidade de inibir a formação ou progressão de produtos Amadori, diminuição de estresse oxidativo e de AGEs (Urios, Grigorova-Borsos e Sternberg, 2007; Pereira, *et al.*, 2012a). Neste estudo, também foi avaliado o efeito dos extratos e frações de *S. impressifolia* na formação dos AGEs *in vitro*. Os resultados mostraram um potente efeito inibitório na formação dos AGEs, indicando uma propriedade antiglicação para esta planta.

A figura 17 apresenta os efeitos e possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito hipoglicemiante/anti-hiperglicêmico da planta. O interesse crescente em plantas com propriedades não apenas anti-hiperglicêmicas, mas também antiglicação torna a *S. impressifolia* uma alternativa de tratamento extremamente promissora.

Figura 17 - Efeito e mecanismo de ação proposto para a planta *Salacia impressifolia*

4.2 PARTE 2: POTENCIAL AÇÃO ANTI-HIPERGLICÊMICA DE UM TRITERPENO DERIVATIVO (T2)

4.2.1 Efeito do extrato bruto das folhas de *C. heterodoxus* (EB-CH), triterpeno natural (T1) e triterpeno derivativo (T2) na curva de tolerância à glicose

Como esperado, a glicemia aumentou significativamente em ratos tratados com sobrecarga (4g/kg) de glicose (grupo hiperglicêmico/hiper) quando comparados ao grupo que não recebeu sobrecarga de glicose (grupo controle) (tabela).

O EB-CH na dose de 50 e 100 mg/kg demonstrou efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante discreto nos tempos 15 e 30 min neste modelo animal de hiperglicemia, quando comparado ao respectivo grupo controle hiperglicêmico (tabela). Nenhum efeito foi observado na dose de 25 mg/kg. Além disso, foi observado o efeito hipoglicemiante clássico da tolbutamida (100 mg/kg), um bloqueador de canais de K^+_{ATP} , após 30 e 60 min em comparação com o grupo hiperglicêmico (Cazarolli *et al.*, 2012; Kappel *et al.*, 2014) (tabela). Os ratos euglicêmicos (controle) apresentaram um perfil inalterado de glicemia ao longo de todo o estudo, como esperado.

Pesquisas comparando o efeito dos triterpenos natural e derivativo (T1 e T2, respectivamente) foram realizadas neste trabalho. Na tabela , o tratamento intraesofágico com 10 mg/kg do T1 em ratos hiperglicêmicos produziu um significativo efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante aos 15 e 30 min e a redução máxima observada foi de 15 %. Por outro lado, não foi observado efeito na dose 1 mg/kg de T1. O efeito anti-hiperglicêmico/hipoglicemiante de T1 já foi constatado em estudo anterior deste grupo de pesquisa (Castro, 2014b). Na

tabela , a administração intraesofágica de T2 (0,1 mg/kg) reduziu a concentração de glicose no soro em ratos hiperglicêmicos nos tempos 15 e 30 min em torno de 22%, e 18%. Adicionalmente, a dose de 1 mg/kg foi a mais eficaz na redução da glicemia em 15, 30 e 60 min de cerca de 36%, 27% e 24%, respectivamente.

Estes resultados indicam a ação anti-hiperglicêmica do extrato bruto das folhas da *C. heterodoxus* (EB-CH), assim como do triterpeno derivativo (T2). Apesar do significativo efeito anti-

hiperglicêmico/hipoglicemiante do T1, este não é tão eficaz como o T2 cuja ação hiperglicêmica foi observada numa dose 10 vezes menor.

Tabela 2- Efeito agudo do EB-CH na concentração de glicose (mg/dL) na curva de tolerância à glicose

Tempo (min)	Grupo I Controle 1%EtO H-H ₂ O	Grupo II Hiper 4 g/kg	Grupo III Hiper+ EB-CH			Grupo III Hiper+ Tolbutamida (100 mg/kg)
			25 mg/kg	50 mg/kg	100 mg/kg	
0	93±2	102±7	105±7	107±4	104±4	96±7
15	94±2	162±7 [#]	159±8	155±10	147±6*	159±7
30	124±3	200±11 ^{###}	197±9	187±8*	175±14*	171±5*
60	110±3	153±4 [#]	155±8	151±10	149±9	125±3*
180	106±3	118±9	121±9	118±6	120±5	115±6

Valores são expressos como média ±E.P.M.; n=6 em duplicata para cada tratamento. [#] $p \leq 0,05$; ^{###} $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle hiperglicêmico.

Tabela 3 - Efeito de T1 e T2 na curva de tolerância à glicose

Tempo (min)	Hiper 4 g/kg	Hiper+ T1		Hiper+T2	
		1 mg/kg	10 mg/kg	0,1 mg/kg	1 mg/kg
0	102±7	106±5	103±3	99±8	98±10
15	162±7 [#]	151±9	137±6**	126±2**	103±7***
30	200±11 ^{###}	193±5	172±1*	163±9*	145±11***
60	153±4 [#]	136±9	149±1	146±11	116±13**
180	118±9	121±6	118±2	121±10	102±7

Valores são expressos como média ±E.P.M.; n=6 em duplicata para cada tratamento. [#] $p \leq 0,05$; ^{###} $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo hiperglicêmico.

4.2.2 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na concentração de insulina sérica

tabela mostra um padrão característico da secreção de insulina após sobrecarga de glicose (4 g/kg) no grupo controle hiperglicêmico. Como esperado, o T2 exibiu uma significativa efeito estimulatório na secreção de insulina de aproximadamente 30% em comparação ao grupo controle no tempo 15 minutos. Portanto, o efeito na regulação da glicemia é, pelo menos em parte, devido ao efeito hipoglicemiante de T2.

Tabela 4- Efeito agudo de T2 na concentração de insulina (ng/mL) na curva de tolerância a glicose

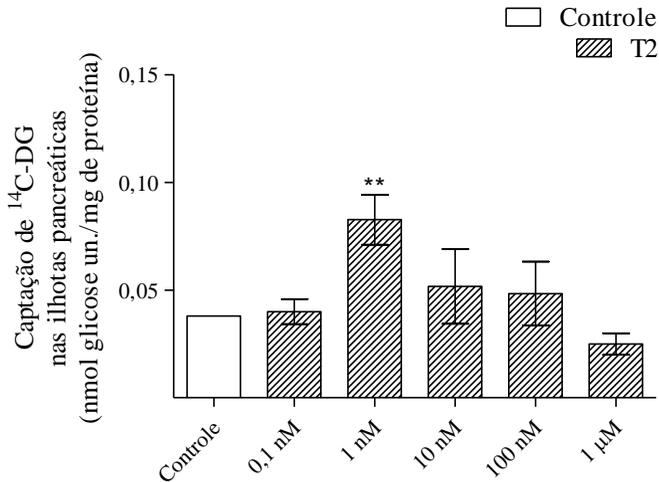
Tempo (min)	Hiperglicêmico	T2 (1 mg/kg)
0	0,5±0,05	0,5±0,06
15	1,3±0,05	1,7,0±0,1*
30	0,59±0,03	0,7±0,02
60	0,65±0,04	0,6±0,01

Valores são expressos como média ± E.P.M.; n=6 em duplicata para cada tratamento. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo hiperglicêmico.

4.2.3 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na captação de ^{14}C -glicose nas ilhotas pancreáticas de rato *in vitro*

Considerando que a captação de glicose pelas ilhotas pancreáticas leva às alterações da permeabilidade da membrana, que resulta no influxo de cálcio, a figura 18 mostra a curva dose-resposta do triterpeno 2 nas concentrações de 0,1 nM a 1 μM na captação de glicose nas ilhotas pancreáticas após 60 minutos de incubação *in vitro*. O efeito estimulatório do T2 foi significativo na concentração de 1 nM e representa um aumento de aproximadamente 310% de captação de glicose comparado ao grupo controle, sugerindo que a captação de glicose pela células β pode estar envolvida no mecanismo de ação na secreção de insulina por T2.

Figura 18- Curva de concentração-resposta de T2 no estímulo da captação de ^{14}C -DG nas ilhotas pancreáticas de ratos



Tempo de pré-incubação = 30 min; Tempo de incubação = 60 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M.; n=8 em duplicata para cada tratamento. ** $p \leq 0,01$ comparado ao grupo controle.

4.2.4 Efeito do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

4.2.4.1 Curva tempo-dependente e concentração-resposta do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos euglicêmicos

No presente estudo, utilizamos o influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ como ferramenta para demonstrar o efeito do T2 no mecanismo de ação relacionado à secreção de insulina pelas células β . Após 60 min na presença de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (equilíbrio de cálcio), as ilhotas pancreáticas foram incubadas na presença ou na ausência do tratamento (T2, 1nM). Na figura 19 A, é observado o influxo de cálcio por μg de proteínas em diferentes tempos (0,5; 1; 5; 10 e 15 min em meio normoglicêmico (5

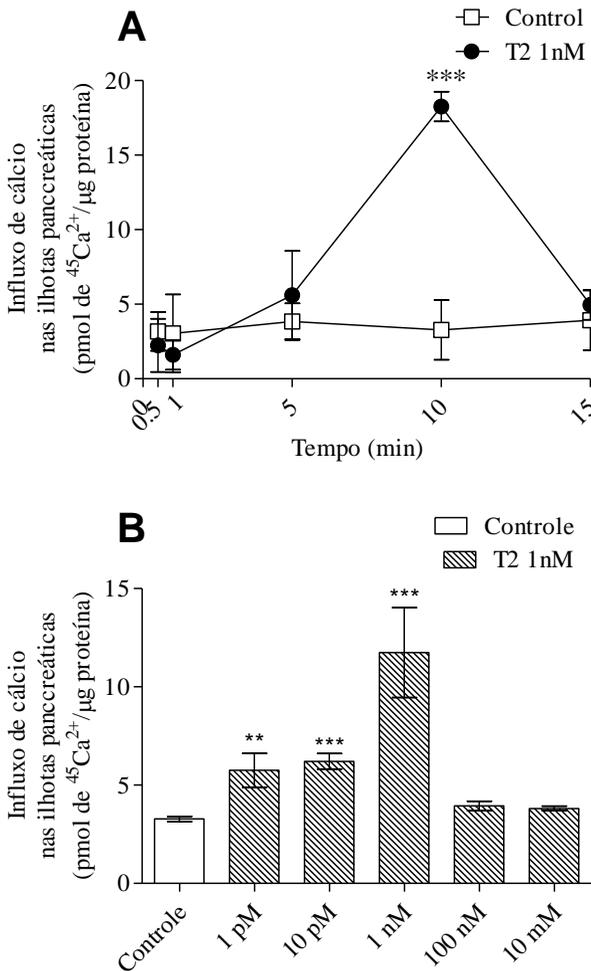
mM de glicose). O T2 produziu um marcante pico de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aos 10 min (aproximadamente 560 %) comparado ao respectivo grupo controle. Nenhuma ação significativa do tratamento foi detectada aos 0,5; 1; 5 e 15 min. A figura 19 B demonstra a curva de dose-resposta do T2. Adicionalmente, o tratamento de T2 na concentração de 1 nM produziu maior influxo de cálcio por μg de proteínas (em torno de 360%) quando comparados ao grupo controle. Em adição, a elevação máxima observada foi de aproximadamente 360% na concentração de 1 nM. Portanto, a captação de cálcio estimulada pelo T2 foi dependente do tempo e da concentração. Com base nisso, em experimentos subsequentes a concentração de 1 nM do T2 e o tempo de incubação de 10 min foram utilizados. Também, como o tempo de 10 min está relacionado à primeira fase de secreção da insulina nas células β pancreáticas, este período foi oportuno para este estudo.

4.2.4.2 Envolvimento de canais de K^+ no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

É bem conhecido que as correntes de Ca^{2+} podem ser influenciadas por outros íons, como íon potássio (K^+) cuja ação está envolvida na manutenção das características elétricas das células. Como esperado, a tolbutamida (figura 20 A), um bloqueador de canais de K^+_{ATP} , que induz a despolarização da célula β , o que permite a abertura dos canais de CCDV-L e consequente entrada deste íon na célula pancreática produziu um efeito clássico descrito na literatura, estimulando em torno de 5 vezes a captação de cálcio quando comparado ao controle. Além disso, foi observado que o efeito estimulatório do T2 no influxo de cálcio foi inalterado na presença de tolbutamida. No entanto, a incubação com diazoxide (agonista de canal K^+_{ATP}) determinou uma diminuição significativa no efeito estimulatório do T2.

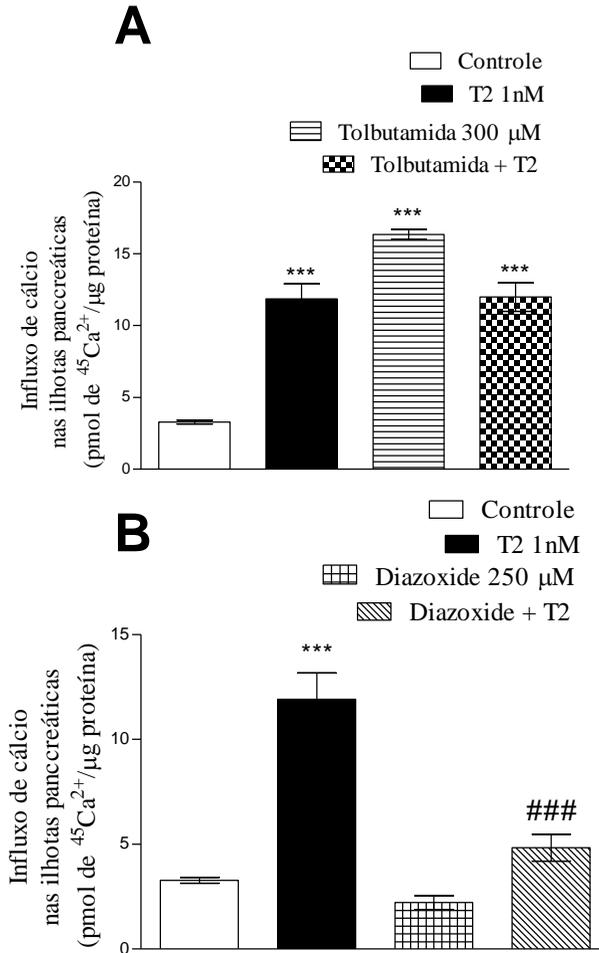
Além disso, a apamina, um bloqueador de canais de $\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}$, não alterou significativamente o efeito estimulatório do T2 (figura 21). Os resultados sugerem que os canais K^+_{ATP} podem estar envolvidos no mecanismo de ação de T2 na secreção de insulina. As concentrações de diazoxide e apamina utilizadas nestes experimentos não alteraram a concentração basal do influxo de Ca^{2+} .

Figura 19 - Curva tempo-dependente (A) e concentração-resposta (B) de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas



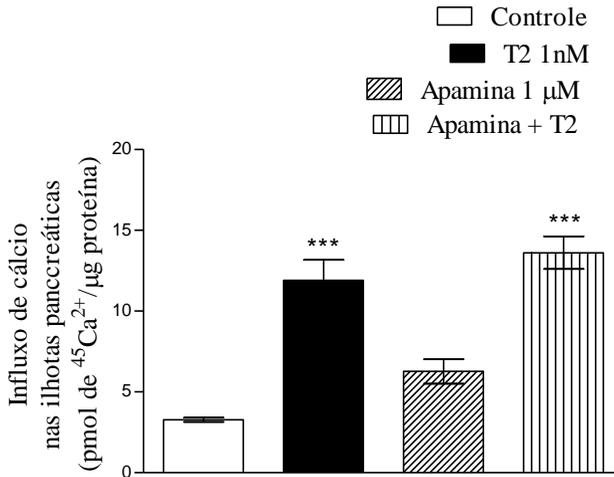
Pré-incubação = 60 min; Incubação= 0 a 15 min. Valores são expressos em média ± E.P.M.; n=8 em duplicata para cada grupo. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

Figura 20 - Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de T2 no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas



(A) Tolbutamida (300 μ M) e (B) diazoxide (250 μ M) presentes durante 15 minutos da pré-incubação e durante a incubação. Tempo de pré-incubação = 60 min; Tempo de incubação = 10 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Todos os experimentos foram conduzidos simultaneamente. *** $p \leq 0,001$; comparado ao grupo controle; ### $p \leq 0,001$ comparado ao T2.

Figura 21– Envolvimento de canais de K^+ - Ca^{2+} no efeito estimulatório de T2 no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas



Apamina (1 μM) presente durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Tempo de pré-incubação = 60 min; Tempo de incubação= 10 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

4.2.4.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório do T2 no influxo $^{45}Ca^{2+}$

A nifedipina (1 μM), bloqueadora de canais de CCDV-L, impede a entrada deste íon na célula. Como esperado, a concentração de nifedipina utilizada não alterou o equilíbrio celular basal do Ca^{2+} . No entanto, a incubação com nifedipina determinou a diminuição (66%) da ação do T2 (figura 22 A). O resultado indica que parte do influxo de $^{45}Ca^{2+}$ induzida pelo T2 foi mediada pela abertura de CCDV-L. O quelante de Ca^{2+} intracelular, BAPTA-AM, foi utilizado com a finalidade de investigar a influência de Ca^{2+} intracelular na ação estimulatória do T2. A figura 22 figura B mostra que o BAPTA-AM, não alterou a concentração basal do influxo de $^{45}Ca^{2+}$. Adicionalmente, o BAPTA-AM não alterou o estímulo do influxo de Ca^{2+} induzida pelo T2, indicando que o Ca^{2+} intracelular não está envolvido na ação deste composto.

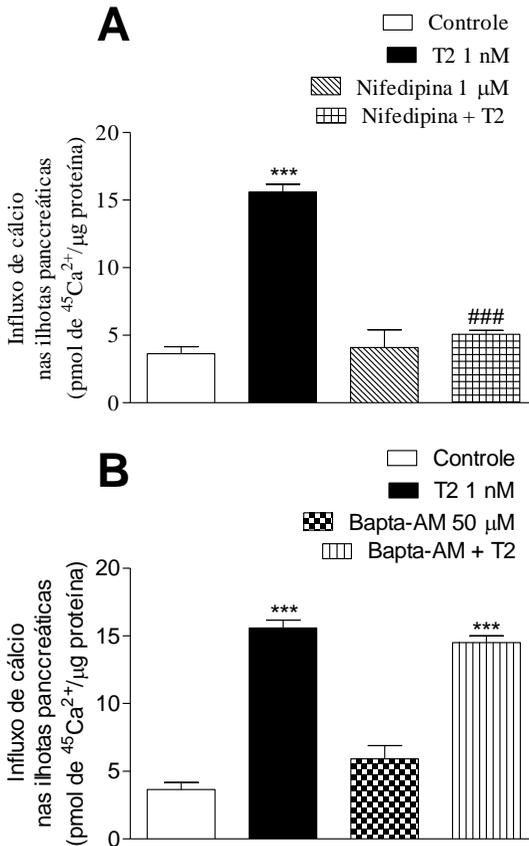
4.2.4.4 Envolvimento da PKC e PKA no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Considerando que as vias que envolvem PKC e PKA podem regular a atividade do canal de cálcio, o envolvimento das cinases PKC e PKA na ação estimulatória do T2 foi investigada. Como mostrado na (figura 23 A), o tratamento de ilhotas pancreáticas com ST, um inibidor da PKC, não teve qualquer influência no influxo basal de cálcio; no entanto, o ST suprimiu significativamente o efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Por outro lado, a incubação com o H-89 (inibidor da PKA) não alterou o estímulo da captação de Ca^{2+} induzido pelo T2 (figura 23 B). Com base nisso, é sugestivo que PKC esteja envolvida no mecanismo de ação de T2.

4.2.5 Efeito do triterpeno derivativo (T2) no trânsito de vesículas de insulina nas ilhotas pancreáticas

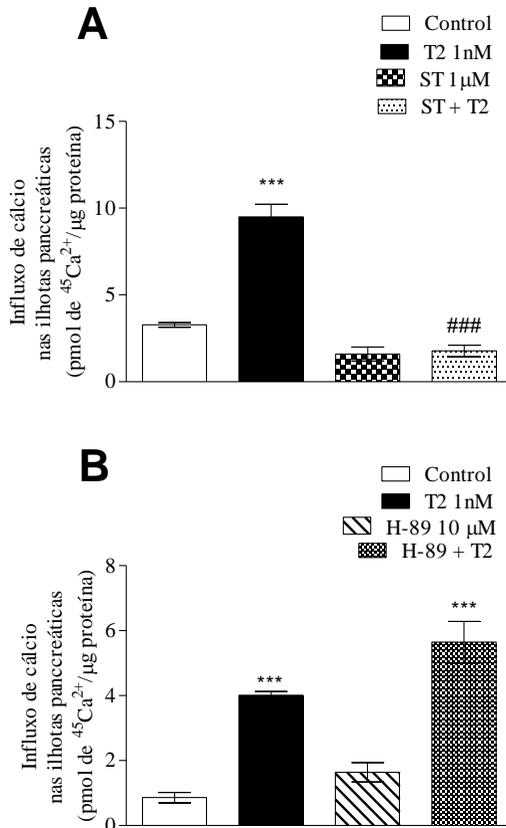
Como mostrado na figura 24**figura**, os grânulos de insulina (pré-formada) presentes nas células β se acumulam próximo à membrana plasmática. No entanto, após a incubação de ilhotas pancreáticas com T2 (1 nM) durante 5 min, foi observado uma redução nos grânulos de insulina em cerca de 90% quando comparado com o respectivo controle hiperglicêmico. Além disso, após 20 min de incubação com o T2, este não foi capaz de alterar a quantidade de vesículas de insulina. Com base nos resultados obtidos, T2 pode atuar promovendo o processo exocitótico dos grânulos de insulina na primeira fase de secreção.

Figura 22 - Envolvimento do CCDV-L e do estoque de Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas



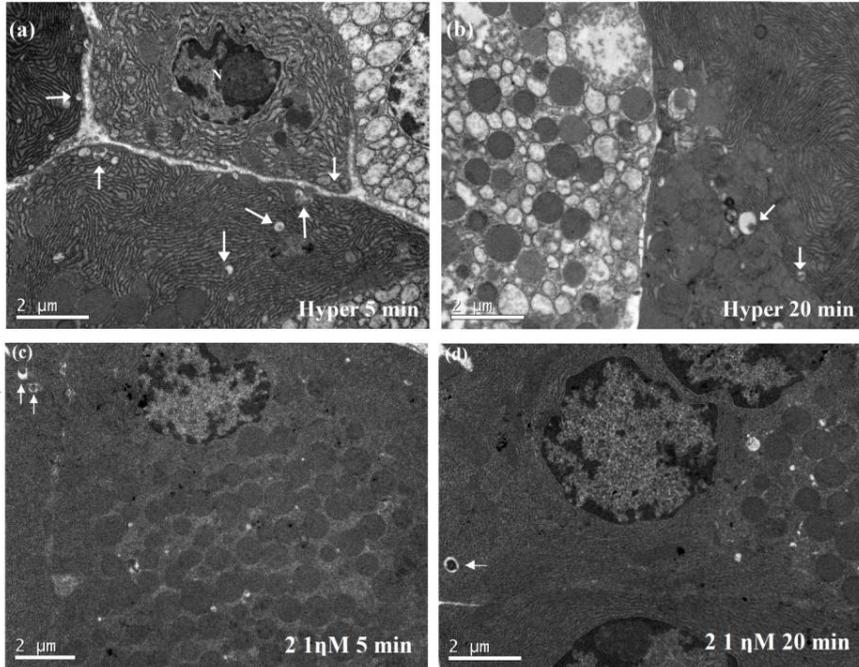
(A) Nifedipina (1 μM) e (B) BAPTA-AM (50 μM) presentes durante os últimos 15 min de pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; incubação = 10 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. Todos os experimentos foram conduzidos simultaneamente. *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo T2.

Figura 23 - Envolvimento das vias da PKA e PKC no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas



(A) ST (1 μM) e (B) H-89 (10 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; incubação= 10 min. Média ± E.P.M..de 3 experimentos independentes. *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo T2.

Figura 24– Microscopia eletrônica de transmissão. Efeito de T2 na translocação de vesículas de insulina nas ilhotas pancreáticas



Número de vesículas insulínicas citoplasmáticas por célula β no estado basal aos 5 e 20 min (Castro et al., 2015) e em presença de T2(1 nM) na primeira e segunda fase da secreção de insulina. Tempo de incubação= 5 e 20 min com/sem T2, n= 20 para o grupo basal hiperglicêmico em 5 min; n= 20 para o grupo Hiper + T2em 5 min; n= 16 para o grupo hipero basal em 20 min e n= 20 para o grupo hiper + T1em 20 min.

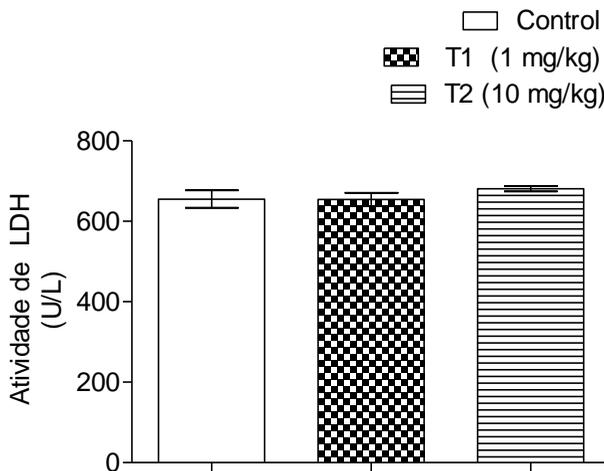
Tempo	5 min		20 min	
	Hiper	Hiper + T2	Hiper	Hiper + T2
Vesículas citoplasmáticas/célula	4,03	0.40	1,62	1,20

Incubação= 5 min ou 20 min.

4.2.6 Efeito de T1 e T2 na atividade da LDH

A atividade da LDH foi determinada 180 min após o tratamento intraesofágico com triterpenos (T1 e T2) (10 e 1 mg/kg, respectivamente). Amostras de sangue e soro foram utilizadas para determinar a atividade do LDH extracelular. Nenhuma alteração da atividade foi detectada sugerindo que os tratamentos não exibem toxicidade neste período e doses estudados (figura 25**figura**). Entretanto, outros ensaios necessitam ser realizados para comprovar efetivamente que este tratamento não exibe toxicidade.

Figura 25 - Efeito de T1 e T2 na atividade de LDH



4.2.7 Discussão

Triterpenos podem regular a homeostasia de glicose por aumentar a secreção de insulina (ação secretagoga) ou por estimular a captação de glicose em tecidos dependentes de insulina (ação insulinomimética) (Castellano *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2015) de modo similar a outros compostos exógenos (nutracêuticos ou medicamentos hipoglicemiantes) (Cazarolli *et al.*, 2009; Damazio *et al.*, 2010; Frederico *et al.*, 2012). A $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 é um composto de grande interesse para o presente grupo de pesquisa em razão de seu efeito hipoglicemiante, porém análogos de a $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 apresentam como desvantagem o alto custo. Em comum, a $1,25(\text{OH})_2$ vitamina D_3 e triterpenos apresentam a origem do esqualeno, o que torna os triterpenos naturais e sintéticos igualmente interessantes (Castro *et al.*, 2014a).

Em relação aos estudos utilizando a planta *C. heterodoxus*, os resultados das curvas de tolerância à glicose demonstraram que o EB-CH apresenta um potencial efeito na regulação da homeostasia da glicose. O triterpeno natural (T1), isolado do extrato bruto da *C. heterodoxus* diminuiu a glicose sérica 10 vezes em relação à planta. Corroborando estes resultados, estudos recentes do grupo verificaram que o triterpeno ácido betulínico também apresenta efeito significativo na redução da glicemia de ratos hiperglicêmicos após o tratamento nos tempos 15, 30 e 60 min (Castro *et al.*, 2014a).

Sabe-se que os diferentes substituintes em diferentes posições na estrutura fundamental de um composto pode determinar a atividade biológica, bem como o modo de ação específico (Alberton *et al.*, 2008; Damazio *et al.*, 2010; Frederico *et al.*, 2012). O novo triterpeno derivativo (T2)(0,1 mg/kg), possui um acceptor de elétrons, o grupo nitro substituinte no anel A, que se destacou por potencializar o efeito hipoglicemiante em torno de 10^2 e 10^3 vezes em comparação ao T1(10 mg/kg). Os resultados indicam que as modificações na estrutura química do composto isolado (T2) tornaram os efeitos biológicos mais eficientes em comparação ao composto natural.

É conhecido que o efeito hipoglicemiante de compostos é devido ao aumento da secreção de insulina. Então, avaliamos o efeito de T2 na concentração sérica de insulina. Neste trabalho, T2 promoveu o aumento da concentração sérica de insulina aos 15 minutos. Os resultados permitem inferir que o efeito hipoglicemiante observado para T2, em parte, ocorre através de mecanismos que envolvem a secreção insulínica.

Considerando que a captação de glicose pelas ilhotas pancreáticas leva às alterações da permeabilidade da membrana (Silva *et al.*, 2013), que resulta no influxo de cálcio e, conseqüente, secreção de insulina, foram realizados estudos *in vitro* com a finalidade de estudar e propor mecanismos por meio do qual T2 aumenta a secreção de insulina pela ilhotas pancreáticas.

O GLUT 2, no pâncreas, exibe baixa afinidade e alta capacidade para o transporte de glicose (K_m -17 mM). A concentração de glicose intracelular é mantida por fluxos bidirecionais de glicose, funcionando como um sensor para a secreção de insulina (Silva *et al.*, 2013). A elevação da concentração de glicose leva ao aumento da proporção de ATP/ADP que induz o fechamento dos canais de K^+_{ATP} , ocasionando a despolarização da membrana plasmática e a ativação dos CCDV. O resultado é o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular e secreção de insulina (Aguilar-Bryan e Bryan, 1999; Gilon e Henquin, 2001). Os canais K^+_{ATP} e CCDV são de destacada relevância fisiológica e molecular, uma vez que eles acoplam o metabolismo bioquímico a atividade elétrica celular (Xu *et al.*, 2015). Em nossas condições experimentais, o efeito estimulatório do T2 (1 nM) na captação de glicose em ilhotas pancreáticas parece contribuir para a secreção de insulina e este evento é mediado por canais de K^+_{ATP} e CCDV-L. Estes resultados vão ao encontro do que aponta a ação de nutracêuticos e fármacos na secreção de insulina mediada por alterações no potencial de membrana das células β , secreção de GLP-1 e secreção de insulina induzida por glicose (Kappel *et al.*, 2013; Guo, Liu e Yin, 2014) ou no efeito em longo prazo e estimulação da proliferação de células β (Tarussio *et al.*, 2014). Entre as vias de secreção da insulina ativadas por compostos naturais e sintéticos, estão descritas a alteração no potencial de membrana da célula- β (despolarização) e a secreção de insulina estimulada pela glicose (Kappel *et al.*, 2013; Guo, Liu e Yin, 2014). Além disso, alguns compostos também afetam a secreção de insulina, ativando a abertura de CCDV sem afetar os canais K^+_{ATP} ou mesmo envolvendo os dois tipos de canais numa via semelhante induzida por glicose (Henquin, 2009; Kappel *et al.*, 2013).

Adicionalmente, o efeito inibitório de ST no influxo de Ca^{2+} estimulado pelo T2 sugere o envolvimento da PKC na ação hipoglicemiante do composto. Os mecanismos que envolvem a ação da PKC no influxo de Ca^{2+} induzida por triterpeno ainda não foram completamente elucidados, mas podemos supor que o T2 induz despolarização das células- β , por meio do efeito direto no fechamento

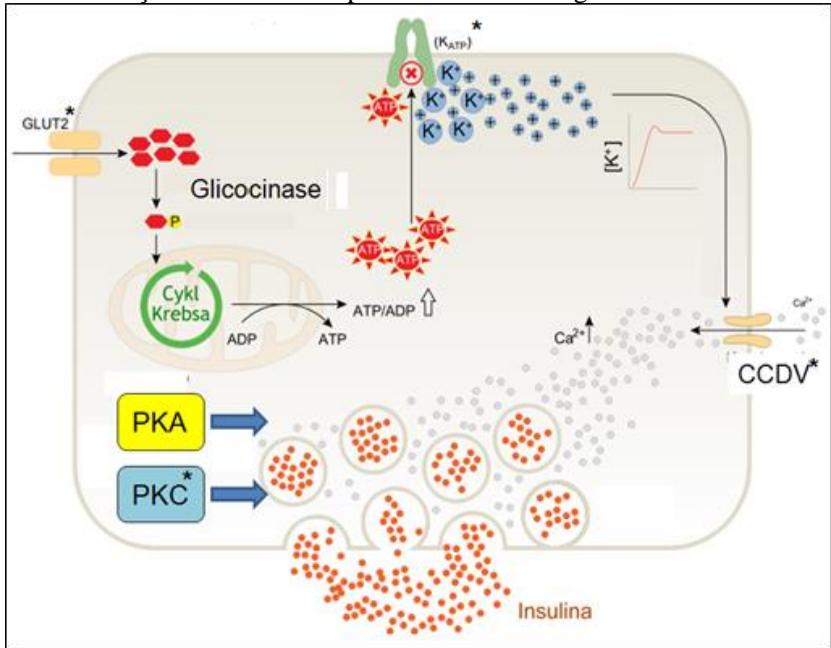
dos canais K^+ , ativação de CCDV -L e promovendo a ativação da PKC (Ahrén, 2009).

Neste trabalho, o T2 não causou toxicidade na dose mais elevada testada depois do tratamento *in vivo* e este resultado está de acordo com outros triterpenos avaliados em protocolo semelhante (Castro *et al.*, 2014b; Castro *et al.*, 2015). Mais estudos precisam ser realizados para avaliar os possíveis efeitos tóxicos de T2.

Para complementar os estudos no pâncreas, foram realizados estudos por meio da MET. É conhecido que entre 3 e 5 min o pâncreas secreta a insulina pré-formada e armazenada nas ilhotas até o momento da extrusão (KAUFMAN, 2011), portanto o modelo neste trabalho, representa a primeira fase de secreção de insulina. Como neste trabalho **figura** , quando o pâncreas foi tratado com o T2, observou-se uma diminuição do número de vesículas. Este resultado pode estar associado ao aumento da translocação de vesículas de insulina no grupo tratado, na primeira fase de secreção. Os resultados apresentados são importantes, já que a deficiência na primeira fase de secreção de insulina é observada desde o início da DM, inclusive do tipo 2.

Em resumo, o T2 diminuiu a glicemia após o tratamento *in vivo*. O efeito hipoglicemiante observado pode ser devido ao aumento da secreção de insulina observado. Estudos *in vitro* possibilitaram estudar e propor mecanismos relacionados a secreção de insulina nas ilhotas pancreáticas. T2 estimulou *in vitro* a captação de glicose e o influxo de Ca^{2+} nas ilhotas pancreáticas de ratos. O T2 atuou aumentando a concentração de cálcio intracelular nas ilhotas pancreáticas por meio do fechamento de canais de K^+_{ATP} , abertura de canais CCDV -L e ativação da PKC. Coletivamente, estes dados apontam o T2 como candidato potencial para a regulação da homeostasia da glicose (figura 26).

Figura 26 - Resumo do efeito *in vitro* do triterpeno derivativo (T2) na via de secreção da insulina no pâncreas de ratos euglicêmicos



(*) transportador de glicose, canais e cinases envolvidos na ação de T2.

4.3 PARTE 3: AÇÃO DO TRITERPENO DERIVATIVO (T2) NO INTESTINO

4.3.1 Efeito do triterpeno derivativo (T2) e sitagliptina na curva de tolerância à glicose

Considerando que a sitagliptina é um fármaco para controle da DM pertencente à classe terapêutica dos inibidores da DPP-IV, experimentos com o objetivo de avaliar o possível efeito hipoglicemiante sinérgico do T2e sitagliptina foram conduzidos. Os resultados do presente estudo demonstram que, como esperado, os ratos hiperglicêmicos tratados exclusivamente com o T2 ou com sitagliptina apresentaram uma redução significativa da glicemia. De modo interessante, no grupo tratado com T2associado à sitagliptina foi observada uma diminuição significativa da glicemia no tempo 30 e 60 min em comparação ao grupo sitagliptina (respectivamente 12% e 15%) ou T2(respectivamente, 12% e 17%) (figura 27**figura**).

4.3.2 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na concentração sérica de GLP-1

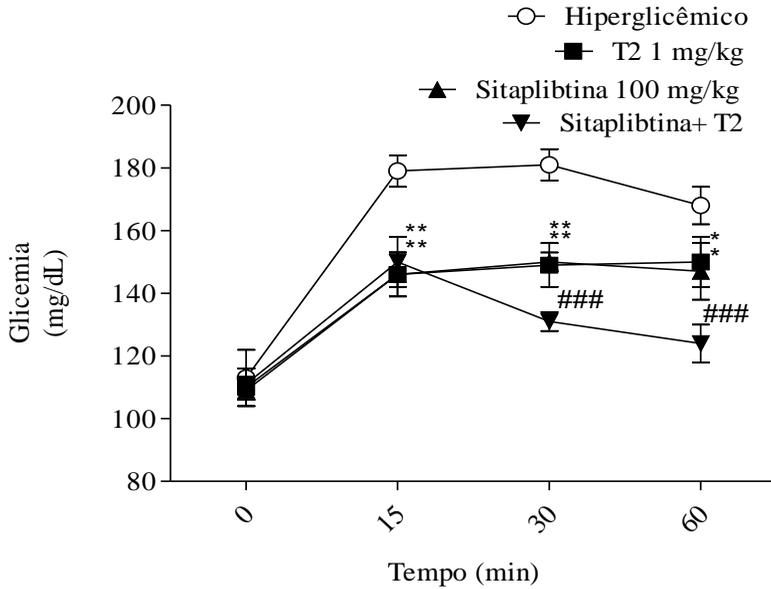
É conhecido na literatura que o fármaco sitagliptina estimula o aumento dos níveis séricos de GLP-1, que por sua vez estimula a secreção de insulina pelo pâncreas. Com base nisso, a **figura** figura 28 demonstra dados relativos à concentração sérica de GLP-1 de ratos hiperglicêmicos tratados com sitagliptina ou T2, do tempo zero a 60 min. Os ratos tratados com sitagliptina ou T2 apresentaram aumento significativo da concentração sérica de GLP-1 de 120% (30 min) e 75% (15 min), respectivamente, quando comparado ao controle. O resultado aponta que o efeito secretagogo de insulina do T2é, pelo menos em parte, devido ao aumento de GLP-1 sérico.

4.3.3 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na atividade de DPP-IV*in vitro*

A inibição farmacológica de DPP-IV, a exemplo da sitagliptina, aumenta a concentração sérica de GLP-1 e, conseqüentemente, de insulina. Com base nisso, um experimento *in vitro* foi conduzido para avaliar a ação do T2 sobre a concentração de DPP-IV. O T2não diminuiu a atividade de DPP-IV. Os resultados apontam que o T2

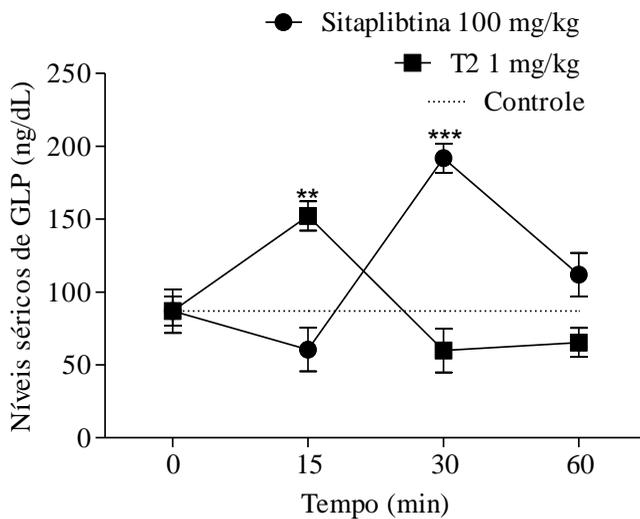
aumenta a concentração de GLP-1 por uma via independente de DPP-IV nas condições experimentais estudadas (figura 29**figura**).

Figura 27- Efeito de T2e sitagliptina na curva de tolerância à glicose

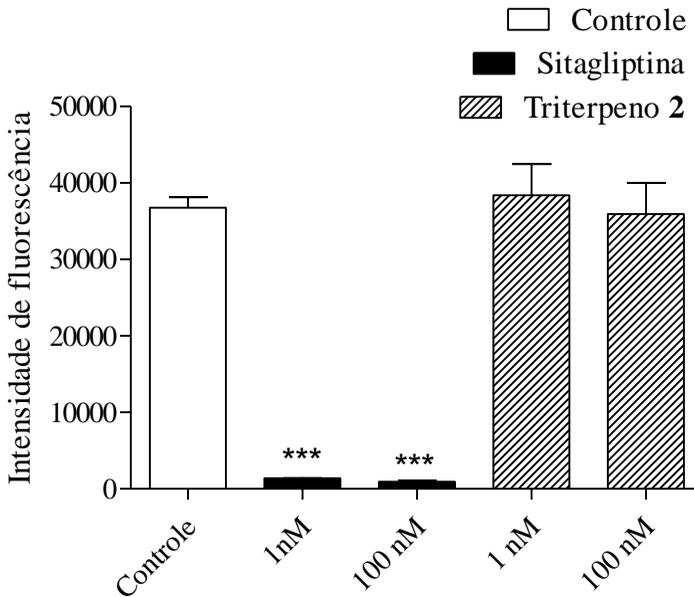


Valores são expressos como média \pm E.P.M; n=8 em duplicata para cada tratamento. ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo T2; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 28- Efeito do T2na concentração sérica de GLP-1



Valores são expressos como média \pm E.P.M; n=8 em duplicata para cada tratamento. *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$ comparado ao grupo controle. Todos os grupos receberam sitagliptina.

Figura 29 - Efeito de T2 na atividade da DPP-IV *in vitro*

Valores são expressos como média \pm E.P.M; n=4 em duplicata para cada tratamento. *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

4.3.4. Efeito do triterpeno derivativo 2 (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em cólon intestinal

4.3.4.1 Curva de concentração-resposta e tempo-dependente do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal

O aumento do cálcio intracelular é etapa crucial para a secreção de GLP-1 pelas células L do intestino. Com base nisso, e com o objetivo de avaliar os mecanismos envolvidos da secreção de GLP-1, o influxo de cálcio no cólon intestinal de ratos foi avaliado. Primeiramente, foi realizada a curva de concentração-resposta. A figura 30 **figura** A mostra que a concentração 10 pM foi mais efetiva na indução do aumento do influxo de cálcio no intestino em 10 min. Ainda, a **figura** figura 30 B mostra o efeito de T2 (10 pM) no influxo de cálcio na curva tempo-

dependente. Com base nisso, a concentração 10 pM e o tempo 10 min foram selecionados para os estudos com agonistas e inibidores.

4.3.4.2 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon intestinal

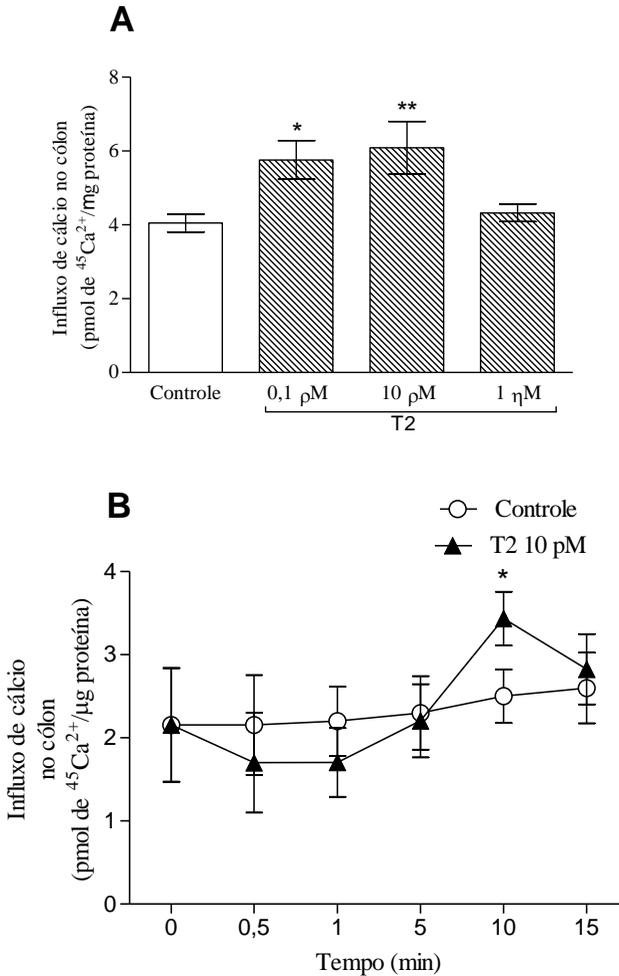
A incubação com a glibenclamida (inibidora do canal K^+_{ATP}) estimulou em torno de 25 % o influxo de $^{45}Ca^{2+}$ quando comparado ao controle, como esperado. Além disso, foi observado o efeito estimulatório do T2 no influxo de cálcio foi inalterada na presença de glibenclamida (figura 31 **figura A**). Por outro lado, a incubação com diazoxide determinou uma diminuição significativa no efeito estimulatório do T2 (**figura** figura 31 B). A concentração de diazoxide utilizada neste experimento não alterou a concentração basal do influxo de Ca^{2+} .

4.3.4.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDV) e cálcio intracelular no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon intestinal

A concentração utilizada de nifedipina não alterou o equilíbrio celular basal do Ca^{2+} . Além disso, a incubação com nifedipina diminuiu (53%) a ação do T2 (figura 32A). O resultado indica que parte da captação de $^{45}Ca^{2+}$ induzida pelo T2 foi mediada pela abertura de CCDV-L.

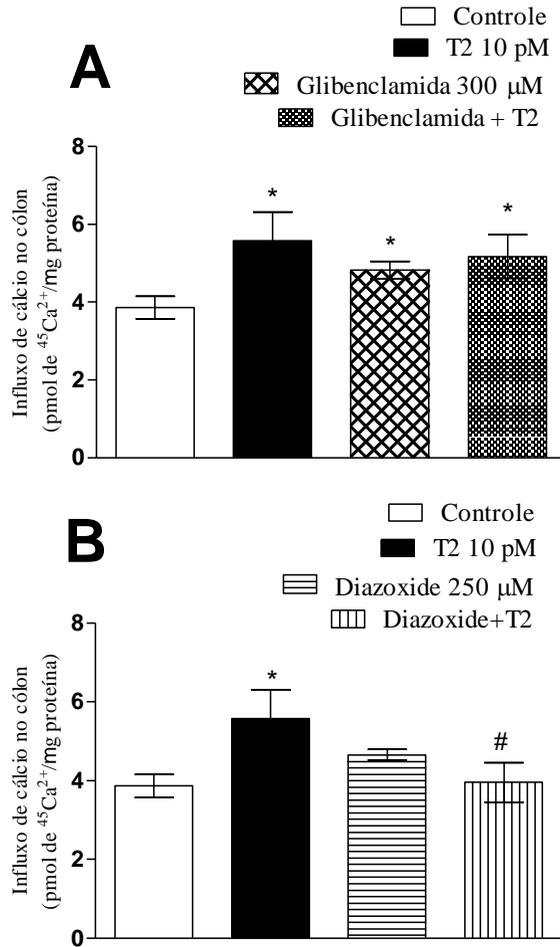
A figura 32 B mostra que o BAPTA-AM, não alterou a concentração basal do influxo de $^{45}Ca^{2+}$. Adicionalmente, o BAPTA-AM não alterou o estímulo da captação de Ca^{2+} induzido pelo T2, indicando que o Ca^{2+} intracelular não está envolvido na ação deste composto.

Figura 30- Curva concentração-resposta (A) e tempo-dependente (B) de T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal



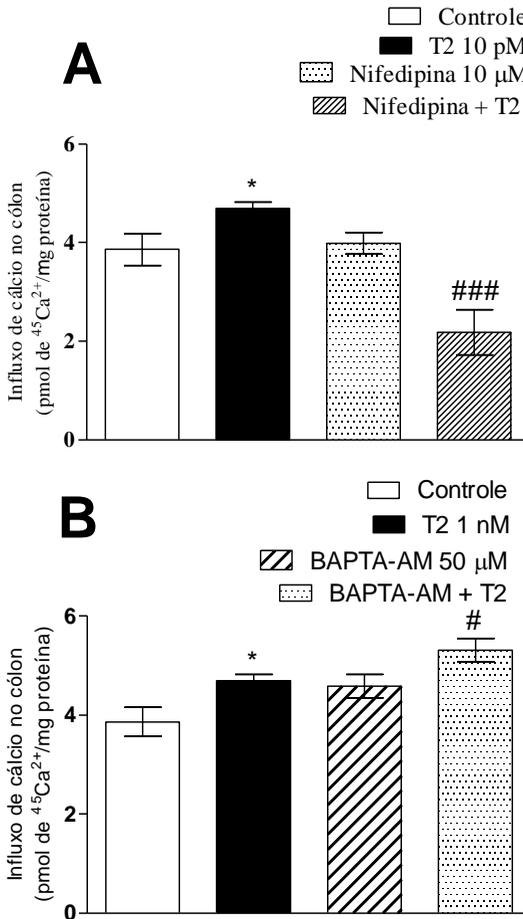
Pré- incubação = 60 min de incubação; Incubação = 10 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M.; n=8 em duplicata para cada grupo. ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

Figura 31- Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de T2 na captação de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon intestinal



(A) Glibenclamida (300 μ M) e (B) diazoxide (250 μ M) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; incubação= 10 min. Média \pm E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo T2.

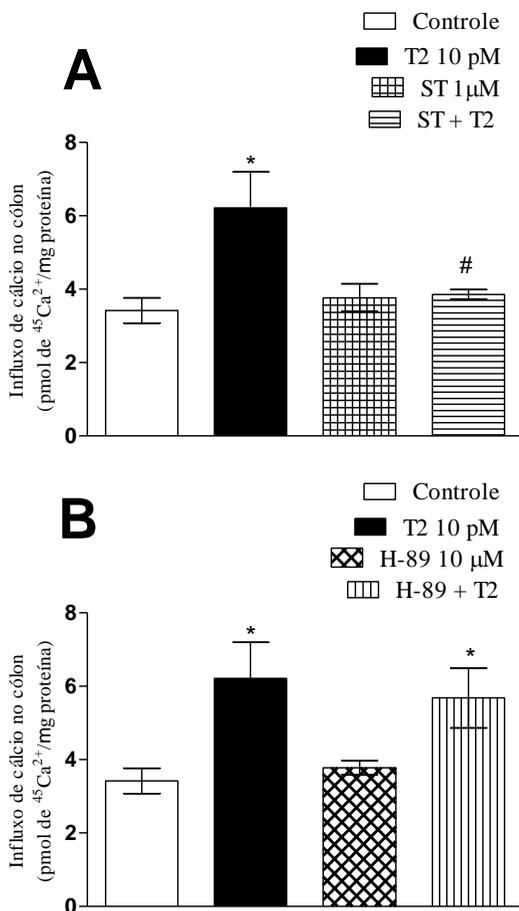
Figura 32- Envolvimento dos CCDV-L e do Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal



(A) Nifedipina (10 μM) e (B) BAPTA (50 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; incubação= 10 min. Média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$; ### comparado ao grupo T2.

4.3.4.4 Envolvimento da PKC e PKA no efeito estimulatório do triterpeno derivativo (T2) no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal

Figura 33- Envolvimento das vias da PKA e PKC no efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon intestinal



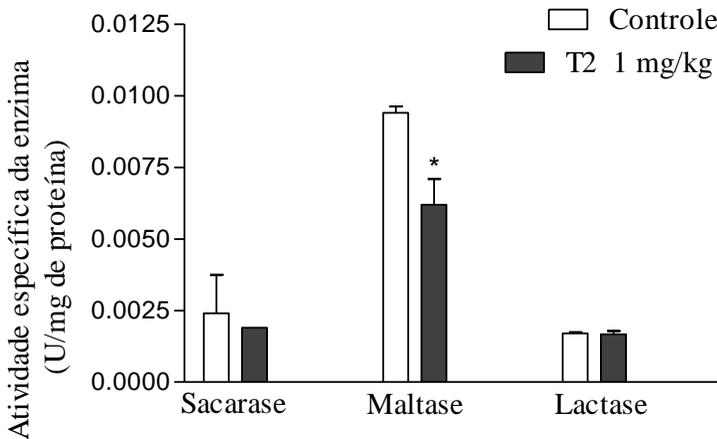
(A) ST (1 μM) e (B) H-89 (10 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação = 60 min; incubação = 10 min. Média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p \leq 0,05$; # $p \leq 0,05$.

Como mostrado na **Figura** figura 33 A, o tratamento de fatias de cólon com ST (1 mM), um inibidor da PKC, não teve qualquer efeito no grupo controle; no entanto, ele suprimiu o efeito estimulatório do T2 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Por outro lado, a incubação a H-89 (inibidor da PKA) não alterou o estímulo no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ induzido pelo T2 (figura 33 B).

4.3.5 Efeito do triterpeno derivativo (T2) na atividade das dissacaridases intestinais

A figura 34**figura** ilustra a atividade específica das enzimas sacarase, lactase e maltase no duodeno de ratos após o tratamento *in vivo* com T2 (1 mg/kg). O grupo tratado apresentou diminuição acentuada da atividade enzimática da enzima maltase em comparação ao grupo controle. Não se observou diferença significativa nas outras enzimas.

Figura 34- Atividade específica da enzima maltase no duodeno de ratos



Valores são expressos como média \pm E.P.M; n=6 em duplicata para cada tratamento. * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle.

4.3.6 DISCUSSÃO

A insulina e o glucagon são potentes hormônios reguladores do metabolismo da glicose e, por décadas, a DM foi considerada uma doença bi-hormonal. Porém, os mecanismos mediados por estes hormônios estão insuficientes para esclarecer alguns pontos na manutenção da glicemia em pacientes com DM (Taha e Klip, 1999; Beardsall *et al.*, 2003; Moore, Cherrington e Wasserman, 2003).

Novas perspectivas sobre a doença surgiram na década de 80, quando diversos hormônios intestinais foram identificados e um deles, o GLP-1, foi reconhecido como importante contribuinte para a manutenção da glicemia. Com isso, foi possível entender o processo de regulação da homeostasia da glicose como resultado da interação com outros hormônios, principalmente a relação dos hormônios pancreáticos (insulina e glucagon) com hormônios intestinais. Pode-se afirmar que a DM passou a ser vista como uma doença multi-hormonal (Baggio e Drucker, 2007; Nauck, 2011).

É conhecido que indivíduos com DM podem apresentar hiperglucagonemia mesmo na presença de hiperglicemia, em decorrência da deficiência da secreção de GLP-1 observada desde os estágios iniciais da DM2. Ainda, é descrito que o paciente apresenta aumento da secreção de glucagon pelas células α , que promove o aumento da gliconeogênese e, conseqüentemente, a hiperglicemia pós-prandial e de jejum. Apesar dos avanços das pesquisas nessa área, o conhecimento permanece limitado. Com base nisso, estudos de compostos que aumentem a secreção ou ação do GLP-1 são muito promissores (Nauck *et al.*, 2011a).

No presente estudo, foi verificado que a sitagliptina e o T2 diminuiram significativamente a glicemia neste modelo animal de hiperglicemia. O tratamento associado de T2 e sitagliptina promoveu um efeito sinérgico, que foi confirmado pela diminuição significativa da glicemia em comparação ao T2 isoladamente. Além disso, foi observado que tanto a sitagliptina quanto o T2 induziram o aumento da concentração sérica de GLP-1 neste modelo animal de hiperglicemia. De modo interessante, o pico de secreção do GLP-1 ocorreu em tempos diferentes: 15 e 30 min, respectivamente, para sitagliptina e T2. Tal particularidade pode estar relacionada a diferentes mecanismos de ação utilizados pelos dois diferentes compostos (Vahl *et al.*, 2003).

A utilização do GLP-1 como agente terapêutico é inviabilizado pela vida média plasmática extremamente curta (menor que 3 min) em

decorrência da rápida inativação por DPP-IV. Um dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração sérica de GLP-1 ocorre por meio da inibição de DPP-IV. Os inibidores da DPP-IV, como a sitagliptina, inibem a secreção de glucagon, aumentam a secreção da insulina e estimulam a proliferação de células L no intestino, produtoras de GLP-1, contribuindo assim com a redução da glicemia (Nauck *et al.*, 2011b). O resultado de uma importante meta-análise demonstra que em comparação a sitagliptina, análogos de GLP-1 são mais eficazes no controle glicêmico e perda de peso (WANG *et al.*, 2014). Alguns compostos atuam reduzindo a glicemia em animais diabéticos por meio de mecanismos que envolvem a interação de GLP-1 os receptores específicos de membrana (Baggio *et al.*, 2004).

No presente trabalho, mesmo que tenha sido observado que o T2 induziu o aumento da concentração sérica de GLP-1, não foi observado a redução da atividade de DPP-IV, apontando o aumento do nível sérico de GLP-1 é devido outro mecanismo. Diante disso, foram realizados estudos *in vitro* utilizando o influxo de cálcio como mecanismo para avaliar o efeito de T2 diretamente nas vias que controlam a secreção de GLP-1 no cólon intestinal. A hipótese do estudo é que a secreção de GLP-1 estimulada por T2 esteja envolvida em vias mediadas pelo influxo de cálcio nas células L.

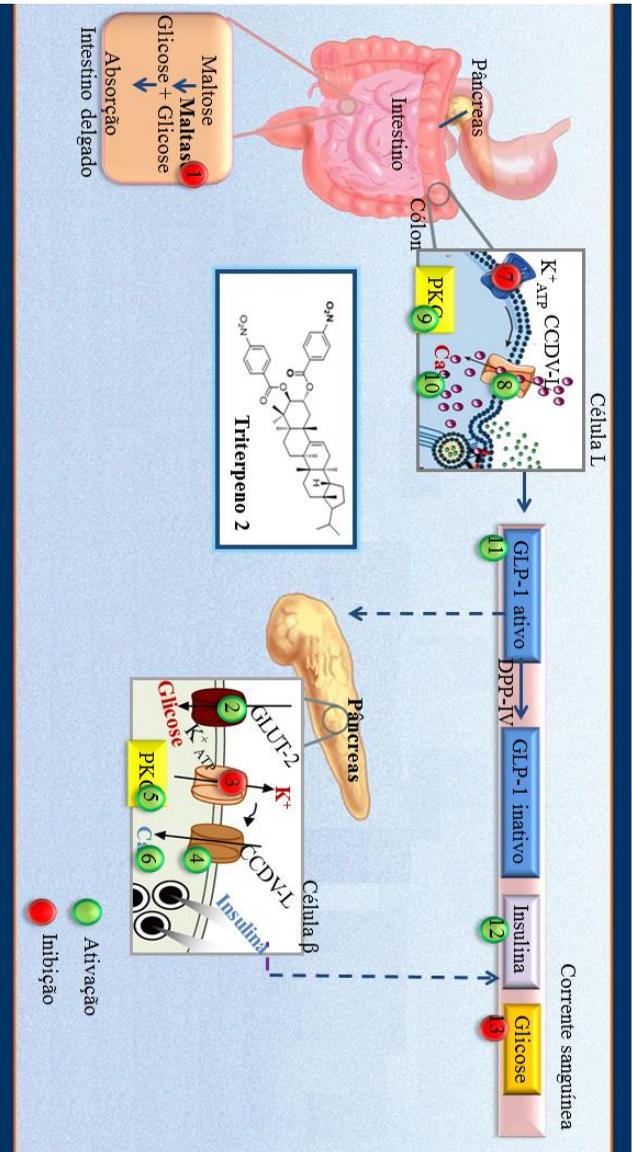
O desenvolvimento de modelos *in vitro* em células-L de murino e de humanos permitiram descrever os mecanismos intracelulares relacionados aos efeitos secretagogos de GLP-1 no intestino. A secreção dos peptídeos intestinais é amplamente descrita em relação às vias intracelulares de Ca^{2+} e cAMP (Reimann *et al.*, 2008). Semelhante as vias descritas para o pâncreas na parte 2 deste trabalho, é apontado que, no intestino, o GLUT 2 afeta a despolarização da membrana plasmática por meio do fechamento dos canais de K^+_{ATP} e abertura de canais CCDV. Além disso, é proposto que a ativação de PKC e PKA também promovem a secreção dos peptídeos intestinais (Mace, Schindler e Patel, 2012).

Nas condições experimentais do presente trabalho, o efeito estimulatório do T2 (10 pM) no influxo de Ca^{2+} no intestino de ratos pode contribuir para a secreção de GLP-1 e este evento, assim como no pâncreas, parece ser mediado por canais de K^+_{ATP} e CCDV-L, uma vez que o agonista desses canais (respectivamente, diazoxide e nifedipina) anularam o efeito estimulatório do triterpeno no influxo de cálcio. A PKC também parece estar envolvida no mecanismo de ação do T2 no cólon.

Para complementar os estudos no intestino, foram realizados também experimentos *in vivo* para verificar o efeito inibitório do T2 frente à atividade das dissacarídes nos quais foi observado que o tratamento inibiu significativamente a atividade da maltase.

A figura 35 apresenta os efeitos de T2 e aponta o possível mecanismo de ação do composto. Nesse sentido, o intestino deve ser considerado um órgão importante na fisiopatologia da DM, sendo importante alvo de ação de T2.

Figura 35 – Efeito e mecanismo de ação proposto para o Triterpeno 2



1. inibe maltase no intestino delgado; **CÉLULAS β 2.** aumenta captação de glicose; **3.** inibe canal K⁺ ATP; **4.** ativa canal CCDV; **5.** aumenta atividade/expressão de PKC; **6.** aumenta influxo de cálcio; **CÉLULAS L 7.** inibe canal K⁺ ATP; **8.** ativa canal CCDV; **9.** aumenta atividade/expressão de PKC; **10.** aumenta influxo de cálcio; **CORRENTE SANGÜÍNEA 11.** aumenta concentração de GLP-1; **12.** aumenta concentração de insulina; **13.** diminui concentração de glicose.

5. CONCLUSÃO

- Foi comprovada a eficácia da utilização popular da *S. impressifolia* para a DM uma vez que o tratamento agudo intraesofágico com o extrato bruto, fração clorofórmio e resíduo insolúvel reduziram significativamente a glicemia de ratos hiperglicêmicos após período agudo de tratamento *in vivo*.

- O mecanismo de ação anti-hiperglicêmica da *S. impressifolia* envolve, pelo menos em parte, a inibição das enzimas α -glicosidases (maltase e sacarase), responsáveis pela absorção intestinal de glicose.

- A observação do efeito anti-glicação *in vitro* da *S. impressifolia* indica que a espécie pode contribuir na prevenção das complicações tardias da DM.

O esclarecimento das ações anti-hiperglicêmicas e anti-glicação da *S. impressifolia* aumenta a segurança e a eficácia da utilização. O entendimento das vias reguladas e/ou envolvidas nas ações da *S. impressifolia* na regulação do metabolismo de carboidratos requer maiores investigações.

- Também, o estudo demonstrou pela primeira vez que a espécie *C. heterodoxus*, assim como o triterpeno derivativo (T2) apresentam significativo efeito na redução da glicemia após tratamento agudo intraesofágico. Adicionalmente, T2 mostrou efeito hipoglicemiante destacadamente melhor quando comparado ao extrato bruto da *C. heterodoxus* e ao triterpeno isolado (T1).

- T2 pode regular a homeostasia da glicose, pelo menos em parte, por aumentar a concentração de insulina sérica. Os dados obtidos por meio da microscopia eletrônica apoiam os resultados, já que T2 induziu rápida translocação das vesículas de insulina do citosol para a membrana plasmática.

- O estímulo da secreção de insulina pode estar associado ao aumento de influxo de cálcio nas células β pancreáticas por meio de mecanismos que envolvem estímulo da captação de glicose, inibição de canais K^+_{ATP} , ativação de canais CCDV-L e PKC.

- Corroboram para demonstrar os mecanismos da ação anti-hiperglicêmica de T2 a indução do aumento da concentração sérica de GLP-1, atualmente, um dos alvos em evidência no tratamento da insulino resistência.

- O estímulo da secreção de GLP-1 pode estar associado ao influxo de cálcio no cólon intestinal por meio de mecanismos que envolvem inibição de canais de K^+_{ATP} , ativação de CCDV-L e a proteína PKC. Demonstrou-se que o aumento da secreção de GLP-1 não é mediado pela inibição da atividade da proteína DPP-IV.
- T2 também atuou inibindo a enzima maltase, que permite a absorção intestinal da glicose.

Os resultados obtidos após o tratamento com T2 *in vivo* e *in vitro* demonstram importante efeito hipoglicemiante e propõe os mecanismos pelos quais T2 regula a glicemia, atuando nos tecidos pancreático e intestinal, por meio da estimulação da secreção de insulina e de GLP-1, assim como por inibir a maltase no intestino. Em comum, T2 atuou de modo semelhante no pâncreas e intestino, aumentando influxo de cálcio por meio da regulação de canais iônicos responsáveis pela secreção insulínica (K^+_{ATP} e CCDV) e regulação da PKC.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HASSAN, I. A.; ABDEL-BARRY, J. A.; TARIQ MOHAMMEDA, S. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of citrullus colocynthis fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 325-30, 2000.
- ADA. American Diabetes Association. **Diagnostic and Classification of Diabetes**: Diabetes Care. 27 2004.
- ADACHI, Y.; YOSHIKAWA, Y.; SAKURAI, H. Antidiabetic zinc(II)-N-acetyl-L-cysteine complex: evaluations of *in vitro* insulinomimetic and *in vivo* blood glucose-lowering ac. **Biofactors**, v. 4, n. 29, p. 213-223, 2007.
- AGUILAR-BRYAN, L. et al. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science**, v. 5209, n. 268, p. 423-426, 1995.
- AGUILAR-BRYAN, L.; BRYAN, J. Molecular biology of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. **Endocrinology Reviews**, v. 2, n. 20, p. 101-135, 1999.
- AHLQVIST, E.; AHLUWALIA, T.; GROOP, L. Genetics of type 2 diabetes. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 241-254, 2011.
- AHN, S. Y.; KIM, G. H.; YOO, H. W. Successful sulfonylurea treatment in a patient with permanent neonatal diabetes mellitus with a novel KCNJ11 mutation. **Korean Journal of Pediatrician**, v. 58, n. 8, p. 309-312, 2015.
- AHREN, B. et al. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 89, n. 5, p. 2078-84, 2004.
- AHREN, B. Vildagliptin: an inhibitor of dipeptidyl peptidase-4 with antidiabetic properties **Expert Opinions Investigations Drugs** v. 15, n. 4, p. 431-42, 2006.

AHREN, B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 369-385, 2009.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Diabetes: a look to the future. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. e1-e2, 2014.

ALBERTON, E. H. et al. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. **Chemico-Biological Interactions** v. 171, n. 3, p. 355-362, 2008.

AMAZON. 2014. Disponível em: <
<http://www.amazonprodutos.com.br/miraruira-em-po.html> >. Acesso em: 17/07/2014.

ANDRADE-CETTO, A.; BECERRA-JIMENEZ, J.; CARDENAS-VAZQUEZ, R. Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 27-32, 2008.

ANNERÉN, C.; WELSH, M.; JANSSON, L. Glucose intolerance and reduced islet blood flow in transgenic mice expressing the FRK tyrosine kinase under the control of the rat insulin promoter. **American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism**, v. 292, n. 4, p. 1183-1190, 2007.

AOYAGI, K. et al. Insulin/phosphoinositide 3-kinase pathway accelerates the glucose-induced first-phase insulin secretion through TrpV2 recruitment in pancreatic β -cells. **Biochemistry Journal**, v. 432, n. 2, p. 375-386, 2010.

ASHCROFT, F. M.; GRIBBLE, F. M. ATP-sensitive K⁺ channels and insulin secretion: their role in health and disease. **Diabetologia**, v. 42, p. 903-919, 1999.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Diabetes mellitus and the beta cell: the last ten years. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1160-1171, 2012.

BAGGIO, L. L. et al. A recombinant human glucagon-like peptide (GLP)-1-albumin protein (albugon) mimics peptidergic activation of

GLP-1 receptor-dependent pathways coupled with satiety, gastrointestinal motility, and glucose homeostasis. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2492-500, Sep 2004.

BAGGIO, L. L.; DRUCKER, D. J. Biology of Incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, 2007.

BARRETO, M. B. et al. Flavonoids and terpenes from *Croton muscicarpa* (Euphorbiaceae). **Química Nova**, v. 36, n. 5, p. 675-679, 2013.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle **Life Sciences**, v. 32, n. 4, p. 315-319, 1983.

BEARDSALL, K. et al. Applied physiology of glucose control. **Currents Pediatrics**, v. 13, p. 543-548, 2003.

BERRIDGE, M. J.; BOOTMAN, M. D.; RODERICK, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 4, p. 517-529, 2003.

BERRIDGE, M. J. et al. Antidiabetic and Hypolipidemic Effect of *Salacia Oblonga* in Streptozotocin Induced Diabetic Rats: **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 6, p.1685-1687, 2012.

BOSI, P. L. et al. Prevalência de diabetes melito e tolerância à glicose diminuída na população urbana de 30 a 79 anos da cidade de São Carlos, São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 53, n. 6, p. 726-732, 2009.

BROWNIEE, M. The pathobiology of diabetic complications. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 2, p. 179-89, 2000.

CASTELLANO, A. et al. Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. **Diabetes**, v. 62, n. 6, p. 1791-1799, 2013.

CASTRO, A. J. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)₂ vitamin D₃ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 48, n. 0, p. 18-27, 2014a.

CASTRO, A. J. **Estudo do efeito e do mecanismo de ação de triterpenos naturais e da 1,25 (OH)₂ vitamina D₃ na homeostasia da glicose: papel destes compostos como secretagogos de insulina e/ou insulínomiméticos**. 2014b. (Tese). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CASTRO, A. J. Acute effect of 3β-hidroxiop-22(29)ene on insulin secretion is mediated by GLP-1, potassium and calcium channels for the glucose homeostasis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. **Journal of Steroids Biochemistry**, v. 150, p. 112-122, 2014c.

CASTRO, A. J. The mechanism of action of ursolic acid as insulin secretagogue and insulínomimetic is mediated by cross-talk between calcium and kinases to regulate glucose balance: **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, p.51-61, 2015.

CAZAROLLI, L. H. Flavonoids: cellular and molecular mechanism of action in glucose homeostasis. **Mini Review of Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1032-1038, 2008.

CAZAROLLI, L. H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C- (2''-O-alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on [¹⁴C] glucose uptake. **Chemico-Biological Interaction**, v. 179, n. 2-3, p. 407-412, 2009.

CAZAROLLI, L. H. Anti-hyperglycemic action of apigenin-6-C-beta-fucopyranoside from *Averrhoa carambola*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 7, p. 1176-83, 2012.

CHEN, W. et al. Two new, 10, oxygenated ent-kaurane-type diterpenes from *Croton kongensis*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 90, p. 1554-1558, 2007.

CHIANG, S. H. et al. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. **Nature**, v. 410, p. 944-948, 2001.

COSTA, N. L. S. et al. **TRITERPENO GLICOSILADO DO CAULE DE *Salacia impressifolia***. XLVII Congresso Brasileiro de Química. Rio Grande do Norte, Brasil: Associação Brasileira de Química 2007.

CRUZ, T. A história do diabetes. In: LYRA, R. e CAVALCANTI, N. (Ed.). **Diabetes Mellitus**. 2ª. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2009. p.23-34.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scandinavia Journal Clinical Laboratory Investigation**, v. 44, p. 169-172, 1984.

DAMAZIO, R. G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1332-1337, 2010.

DE SOUSA, E. et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **Journal of Natural Products** v. 67, n. 5, p. 829-832, 2004.

DEL PRATO, S.; TIENGO, A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes and Metabolism Research Reviews**, v. 17, p. 1164-1174, 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2009.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 488-500, 2009.

ELLIS, H. Anatomy of the pancreas and the spleen. **Surgery**, v. 31, p. 6, 2013.

FENG, L. S. S. F.-S. P. et al. The C-terminal tails of 4,4'-diphenylmethane-bis(methyl) carbamate are essential for binding to receptor for advanced glycation end products to

attenuate advanced glycation end products-induced inflammation and apoptosis responses in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 93-106, 2016.

FERRER, J. C. et al. Control of glycogen deposition. v. 546, n. 1, p. 127-32., 2003.

FESTA, A. et al. Beta cell dysfunction in subjects with impaired glucose tolerance and early type 2 diabetes. **Diabetes**, p. 638-644, 2008.

FOLADOR, P. et al. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1180-7, 2010.

FOWLER, M. J. Diabetes Treatment, Part 2: Oral Agents for Glycemic Management. **Clinical Diabetes**, 2007. Disponível em: < <http://clinical.diabetesjournals.org/content/25/4/131.extract> >.

FREDERICO, M. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Currents Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2049-2058, 2012.

GHENI, G. et al. Glutamate acts as a key signal linking glucose metabolism to incretin/cAMP action to amplify insulin secretion. **Cell reports**, v. 9, n. 2, p. 661-673, 2014.

GILON, P.; HENQUIN, J. C. Mechanisms and physiological significance of the cholinergic control of pancreatic beta-cell function. **Endocrine Reviews**, v. 5, n. 22, p. 565-604, 2001.

GOH, S.; COOPER, M. E. The role of advanced glycation end products in progression and complications **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 93, p. 1143-1152, 2008.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. *Croton*. In: (Ed.). **World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. London: Royal Botanic Gardens Kew, 2000. p.417-536.

GRILLO, M. L. et al. Testosterone rapidly stimulates insulin release from isolated pancreatic islets through a non-genomic dependent

mechanism. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 11, p. 662-665, 2005.

GROVER, J.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 81-100, 2002.

GUAL, P. L. E.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 1, n. 97, p. 99-109, 2005.

GUO, L. X.; LIU, J. H.; YIN, F. Regulation of insulin secretion by geniposide: possible involvement of phosphatidylinositol 3-phosphate kinase. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1287-1289, 2014.

HARDIE, D. G. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, p. a00603, 2012.

HENQUIN, J. C. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. **Diabetologia**, v. 5, n. 52, p. 739-751, 2009.

HERMAN, G. A. et al. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes: focus on sitagliptin **Clinical Pharmacology Therapeutics**, v. 81, n. 15, p. 761-767, 2007.

HOLST, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 4, p. 1409-1439, 2007.

HUMPHREY, A. J.; BEALE, M. H. Terpenes. In: CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N., *et al* (Ed.). **Plant Secondary Metabolites**. Oxford, U.K: Blackwell Publishing Ltd 2006. p.47-101.

IDF. **IDF DIABETES ATLAS**. International Diabetes Federation 2015.

IVORRA, M. D.; PAYÁ, M.; VILLAR, A. A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs. **Ethnopharmacology**, v. 27, p. 243-275, 1989.

JAGER, S. et al. Pentacyclic triterpene distribution in various plants - rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 11^a. São Paulo: Editora Nacional, 1993. 777p.

KAHN, S. E. Beta cell failure: causes and consequences. **International Journal of Clinical Practices Supplementary**, v. 123, p. 13-18, 2001.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; DEL PRATO, S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future. **The Lancet**, v. 383, n. 9922, p. 1068-1083, 2014.

KAMP, T. J.; HELL, J. W. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. **Circulation Research**, v. 87, p. 1095-1102, 2000.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine Journal**, v. 53, p. 167-293, 2006.

KAPPEL, V. D. et al. Short and Long-Term Effects of *Baccharis articulata* on Glucose Homeostasis. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6754-6768, 2012-06-04 2012.

KAPPEL, V. D. et al. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. **European Journal of Pharmacology**, v. 702, n. 1-3, p. 264-268, 2013.

KAPPEL, V. D. et al. Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: Multiple sites of action. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 706-715, 2014.

KARMAKAR, R. et al. Albuminuria and neuropathy in newly detected diabetics: profile and correlation. **Journal of the Indian Medical Association**, v. 109, n. 6, p. 396-399, 2011.

KAUFMAN, R. J. Beta-Cell Failure, Stress, and Type 2 Diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1931-1933, 2011.

KENNETH, S.; POLONSKY, M. The Past 200 Years in Diabetes. **New England Journal Medicinal**, v.367, p.1332-1340, 2012.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 4, p. 511-516, 2013.

KOOPMAN, R. J. et al. Evidence of nephropathy and peripheral neuropathy in US adults with undiagnosed diabetes. **Annals of family medicine**, v. 4, n. 5, p. 427-432, 2006.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. α -Glucosidases. **Biochemistry** v. 66, n. 323, p. 267-281, 2001.

KRAUSS, G. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**. In: Intracellular Messenger Substances: "Second Messengers". 3 ed. Darmstadt: Druckhaus Darmstadt GmbH, 2003.

LACY, P. E.; KOSTIANOVSKY, M. Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. **Diabetes**, v. 16, n. 1, p. 35-39, 1967.

LI, P. et al. Inhibition of NA(+)/H(+) Exchanger 1 Attenuates Renal Dysfunction Induced by Advanced Glycation End Products in Rats. **Journal of Diabetes Research**, 2016. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26697498>.

LIETZKE, S. E. et al. Structural Basis of 3-Phosphoinositide Recognition by Pleckstrin Homology Domains. **Molecular Cell**, v. 6, n. 2, p. 385-394, 8// 2000. ISSN 1097-2765. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276500000381>>.

LIN, J. A. et al. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. **Molecular**

Nutrition & Food Research, 2016. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26774083 >.

LINDBLOM, R. et al. Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy. **The Review of Diabetics Studies**, v. 12, n. 1-2, p. 134-56, 2015.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The journal of Biological and Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUBITZ, I. et al. High dietary advanced glycation end products are associated with poorer spatial learning and accelerated A β deposition in an Alzheimer mouse model. **Aging Cell**, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26781037> >.

LYRA, R.; CAVALCANTI, N. **Diabetes Mellitus**. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2009. 788.

MA, N. et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. **Journal of Clinical investigation**, v. 91, p.301-307, 1987.

MACE, O. J.; SCHINDLER, M.; PATEL, S. The regulation of K- and L-cell activity by GLUT2 and the calcium-sensing receptor CasR in rat small intestine. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 12, p. 2917–2936, 2012.

MASTRACCI, T. L.; SUSSEL, L. The endocrine pancreas: insights into development, differentiation, and diabetes. **WIREs Dev Biol**, v. 5, p. 609-628, 2012.

MIKHAILOV, M. V. et al. Expression of functionally active ATP-sensitive K-channels in insect cells using baculovirus **FEBS Letter**, v. 429, p. 390–394, 1998.

MILWARD-DE-AZEVEDO, M. A.; VALENTE, M. C.; MARQUETE, R. Hippocrateaceae da mata de encosta do jardim botânico do rio de janeiro e arredores, Rio de Janeiro, RJ. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 64, n. 1, p. 3-10, 2006.

MISAWA, N. Pathway engineering for functional isoprenoids. **Currents Opinions of Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 627-633, 2011.

MOLLEMA, E. D. et al. Diabetes Fear of Injecting and Self-Testing Questionnaire: a psychometric evaluation. **Diabetes Care**, v. 6, n. 23, p. 765-769, 2000.

MOORE, M. C.; CHERRINGTON, A. D.; WASSERMAN, D. H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, p. 343-364, 2003.

MORAES, S. A. D. et al. Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, 2006: Projeto OBEDIARP. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 5, n. 26, p. 929-941, 2010.

NAUCK, M. et al. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-independent) diabetes. **Diabetologia**, v. 29, p.46-52 p. 1986.

NAUCK, M. et al. Normalization of fasting hyperglycaemia by exogenous glucagon-like peptide 1 (7-36 amide) in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. **Diabetologia**, v. 8, p.741-744, 1993.

NAUCK, M. et al. Incretin-Based Therapies for Type 2 Diabetes Mellitus: Properties, Functions, and Clinical Implications. **The American Journal of Medicine**, v. 124, n. 1, Supplement, p. S3-S18, 2011a.

NAUCK, M. et al. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down?, **Diabetologia**, v. 54, n. 1, 2011b.

NENQUIN, M.; HENQUIN, J. C. Sulfonylurea receptor-1, sulfonylureas, and amplification of insulin secretion by Epac activation in β -cells. **Diabetes and Obesity Metabolism**, Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26584950>.

NEWSHOLME, P.; GAUDEL, C.; MCCLENAGHAN, N. H. Nutrient regulation of insulin secretion and beta-cell functional integrity.

Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 654, p. 91-114, 2010.

NOMA, A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. **Nature**, v. 305, p. 147–148, 1983.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2th. San Diego: Academic Press, 1997. 558.

PATEL, D. et al. Natural medicines from plant source used for therapy of diabetes mellitus: An overview of its pharmacological aspects. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 3, p. 239-250, 2012.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clinical Diabets**, v. 21, n. 4, p. 186-187, 2003.

PEREIRA, D. F. et al. Effects of flavonoids on α -glucosidase activity: Potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition**, v. 27, p. 1161–1167, 2012a.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 20, p. 868-877, 2012b.

PETERSEN, K. F. et al. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 31, p. 12587-12594, 2007.

PEYROT, M.; RUBIN, R. R.; LAURITZEN, T. The international dawn advisory panel. Resistance to insulin therapy among patients and providers. **Diabetes Care**, v. 11, n. 28, p. 2673-2679, 2005.

PRINCIPALLI, M. A. et al. Kir6.2 activation by sulfonylurea receptors: a different mechanism of action for SUR1 and SUR2A subunits via the same residues. **Physiological Research**, v. 9, n. 3, 2015.

REIMANN, F. et al. Glucose sensing in L cells: a primary cell study **Cell Metabolism**, v. 8, p. 532–539, 2008.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscop. **The Journal of Cell Biology**, v. 17, p. 208-212, 1963.

ROSSI, D. et al. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador Croton lechleri Mull. Arg. (*Euphorbiaceae*) stem bark essential oil: a new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v. 126, p. 837-848, 2011.

ROSSO, A. et al. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D3 stimulates rapid plasma membrane calcium influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 146-154, 2012.

RUANI, A. P. **Investigação fitoquímica e biológica da espécie vegetal Salacia impressifolia**. 2014. 108 (Mestrado). Departamento de Química, UFSC, Florianópolis.

S.R. FILHO, H. et al. Outros triterpenos do caule de salacia impressifolia (Hippocrateaceae) **31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia - SP, 2008. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0013-2.pdf> >.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 6865, n. 414, p. 799-806, 2001

SANDHIYA, S.; DKHAR, S. A. Potassium channels in health, disease & development of channel modulators. **Indian Journal of Medical Research**, v. 129, p. 223-232, 2009.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes**. São Paulo: AC Farmacêutica: 365 p. 2014.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 364-71, 2004.

SCHMIDT, É. C. et al. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta,

Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 860-869, 2009.

SCHULZ, L. O.; R.C, W. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in Mexico. **Progress Food & Nutrition Science**, v. 17, n. 2, p. 99-117, 1993.

SCHULZ, L. et al. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1866-1871, 2006.

SHEENA, A. et al. Elucidation of the Glucose Transport Pathway in Glucose Transporter 4 via Steered Molecular Dynamics Simulations. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. e25747, 2011.

SHIGETO, M. et al. GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. **the Journal of Clinical Investigation**, v. 25, n. 12, p. 4714-4728, 2015.

SILVA, F. R. M. B. et al. GLUCOSE UPTAKE: KNOWLEDGE FROM *IN VIVO*, *IN SITU* AND *IN VITRO* STUDIES AND HEALTH IMPLICATIONS. In: JOHNSON, C. C. e WILLIAMS, D. B. (Ed.). **Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications**. 1. New York: NOVA SCIENCE PUBLISHERS, v.1, p.1-44. (Endocrinology Research and Clinical Developments), 2013.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Mark's Basic Medical Biochemistry: A clinical approach** 2th. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SOLTÉSZ, Z. et al. Studies on the insulinomimetic effects of benzylamine, exogenous substrate of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzyme in streptozotocin induced diabetic rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 6, n. 114, p. 851, 2007.

STEFAN, S. et al. **Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes of the Young**: New England Journal of Medicine, v. 345, p.971-980, 2001.

STEINER, D.; OYER, P. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. **National**

Academy of Sciences of the United States of America, v. 57, p. 473-480, 1967.

STOLERMAN, E.; FLOREZ, J. Genomics of type 2 diabetes mellitus: implications for the clinician. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, n. 8, p. 429-443, 2009.

STOLZING, A. et al. Degradation of glycated bovine serum albumin in microglial cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, n. 6, p. 1017-1027, 2006.

SUBRAMANIAN, R.; ASMAWI, M. Z.; SADIKUN, A. *In vitro* alpha-glucosidase and alpha-amylase enzyme inhibitory effects of *Andrographis paniculata* extract and andrographolide. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 2, p. 391-398, 2008.

SUGIMOTO, K.; YASUJIMA, M.; YAGIHASHI, S. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 10, p. 953-961, 2008.

TAHA, C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **Journal of Membrane Biology** v. 169, p. 1-12, 1999.

TARUSSIO, D. et al. Nervous glucose sensing regulates postnatal β cell proliferation and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 1, p. 413-424, 2014.

TUCKER, S. J. et al. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K^+ channels in the absence of the sulphonylurea receptor **Nature**, v. 387, p. 179-183, 1997.

UNESC, U. D. E. S. C. *Croton heterodoxus* Baill. **Herbarium Pe. Dr. Raulino Reitz** Criciúma, Santa Catarina, 2014. Disponível em: <<http://www.bib.unesc.net/biblioteca/sumario/000049/0000499D.PDF>>. Acesso em: 24/03/2014.

URIOS, P.; GRIGOROVA-BORSOS, A. M.; STERNBERG, M. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 139-46, 2007.

USP, U. D. S. P. Hippocrateaceae: *Salacia impressifolia*. **Guia Igapó**, 2014. Disponível em: <<http://ecologia.ib.usp.br/guiaigapo/familias/hippocrateaceae/salacia_impresifolia/salacia_impresifolia.html>. Acesso em: 24/03/2014.

VAHL, T. P. et al. Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1772-1779, 2003.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A. H.; BELL, M. **Practical Biochemistry**. 5. London, UK: I.W. Heineman, 1976.

WAUTIER, J. L.; GUILLAUSSEASU, P. J. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. **Diabetes and Metabolism** v. 27, p. 535–542, 2001.

WEISS, F. U. New advances in pancreatic cell physiology and pathophysiology **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 22, p. 3–15, 2008.

WILD, S. et al. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v. 27, n. 5, p. 1047-1053, 2004.

WU, J. et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. **Science**, v. 350, n. 6267, p. aad2395, 2015.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 261–291, 2004.

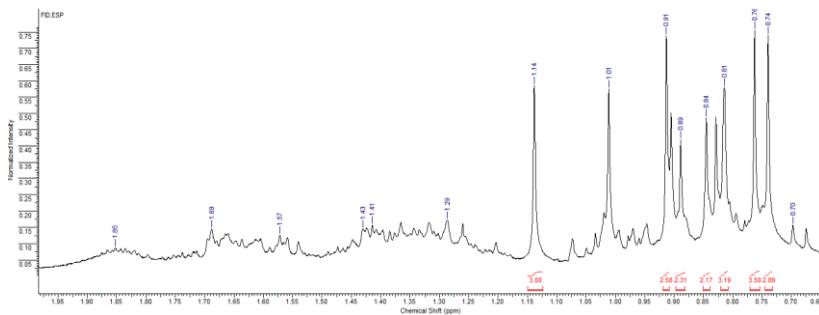
XU, S. et al. Autocrine insulin increases plasma membrane KATP channel via PI3K-VAMP2 pathway in MIN6 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 468, n. 4, p. 752-757, 2015.

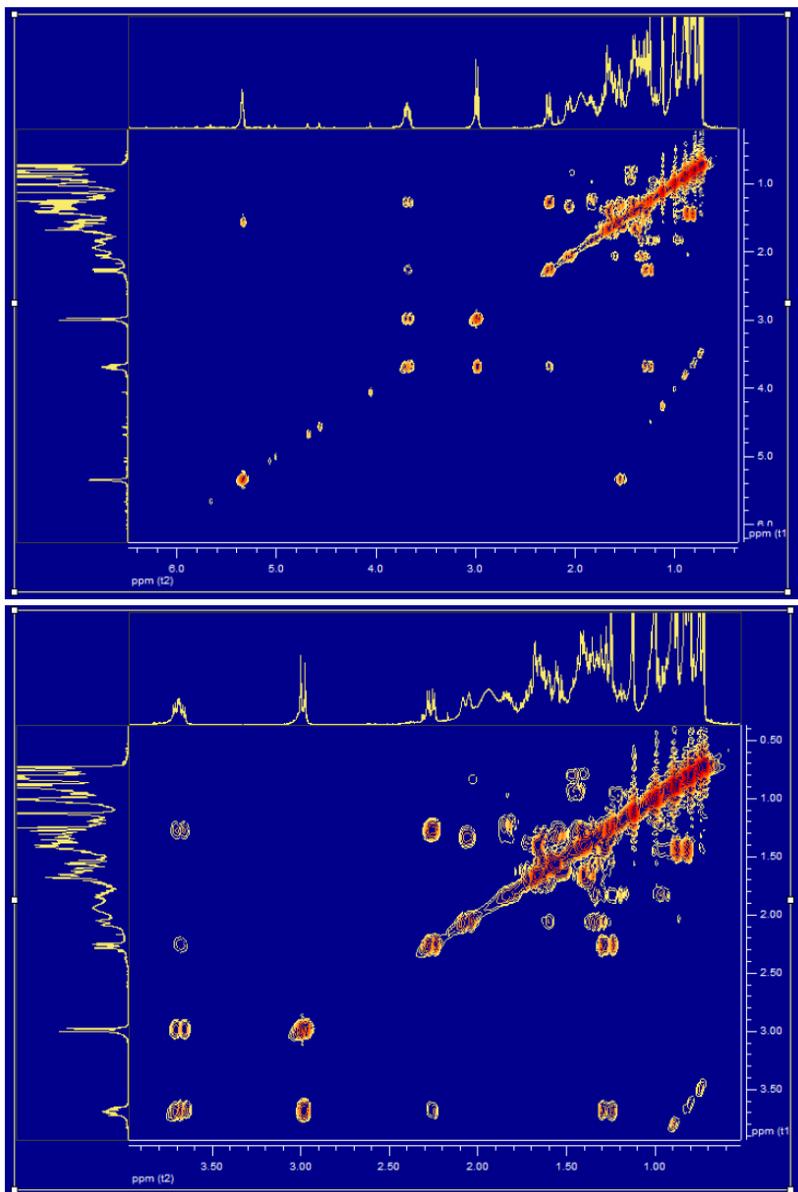
YOUNGREEN, J. F. Regulation of insulin receptor function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 7-8, n. 64, p. 873-891, 2007.

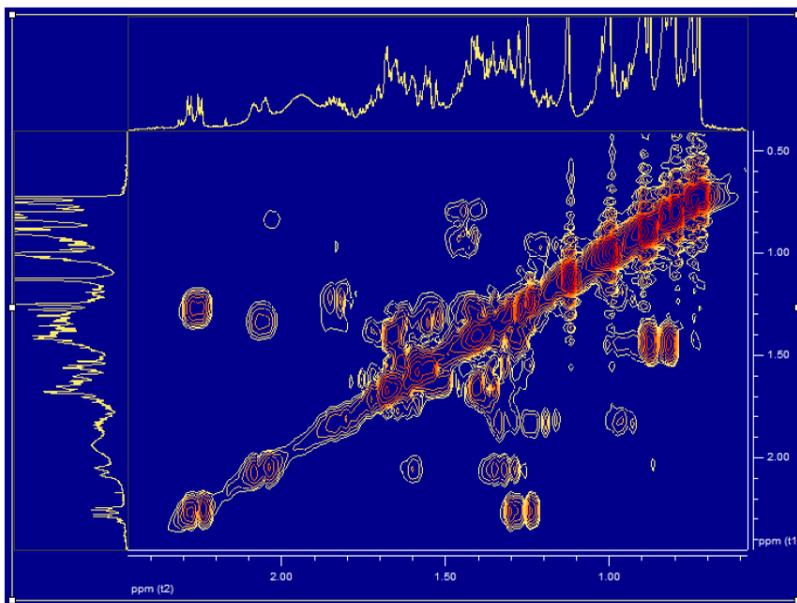
ZANATTA, L. et al. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **Journal of Natural Products**, v. 4, n. 71, p. 532-535, 2008.

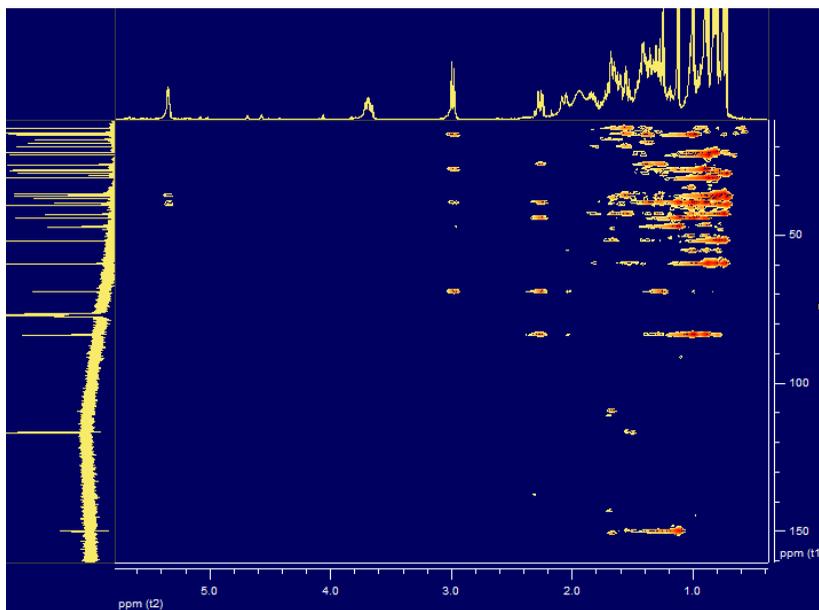
ZANATTA, L. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D(3) signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10284-10292, 2011.

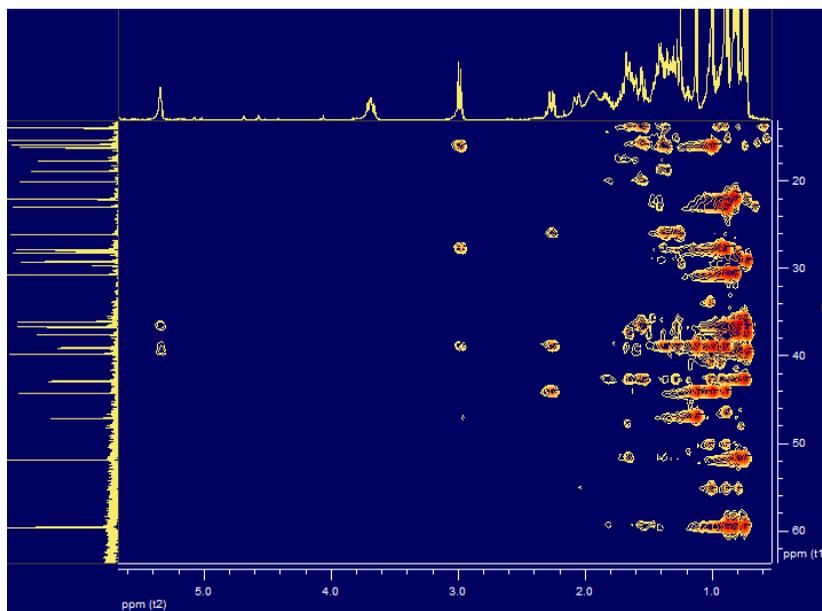
ZOU, G. et al. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomenstosus* Hook. **Molecules**, v. 15, p. 1097-1102, 2010.

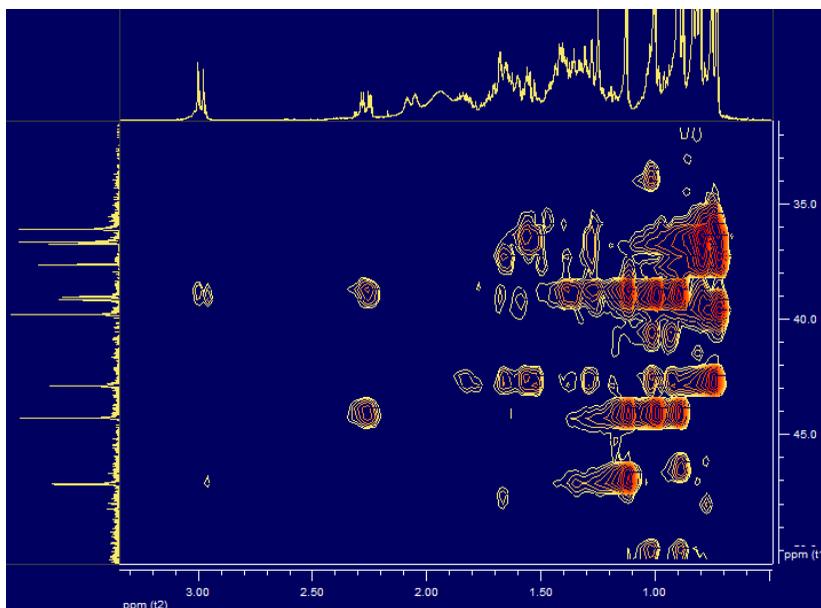
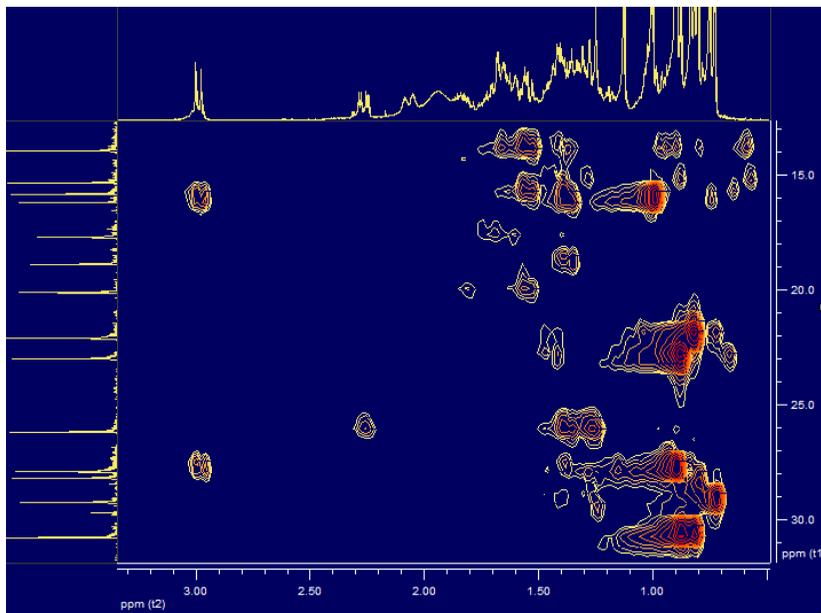


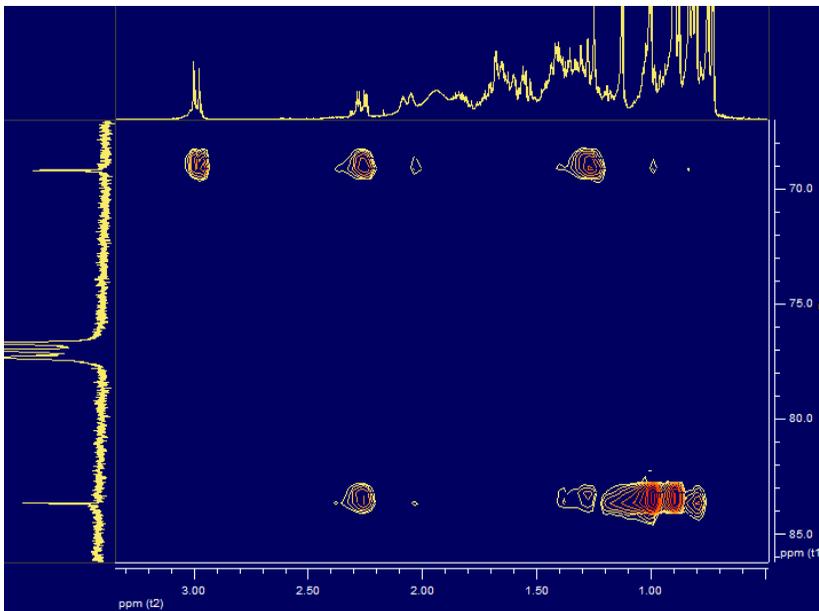
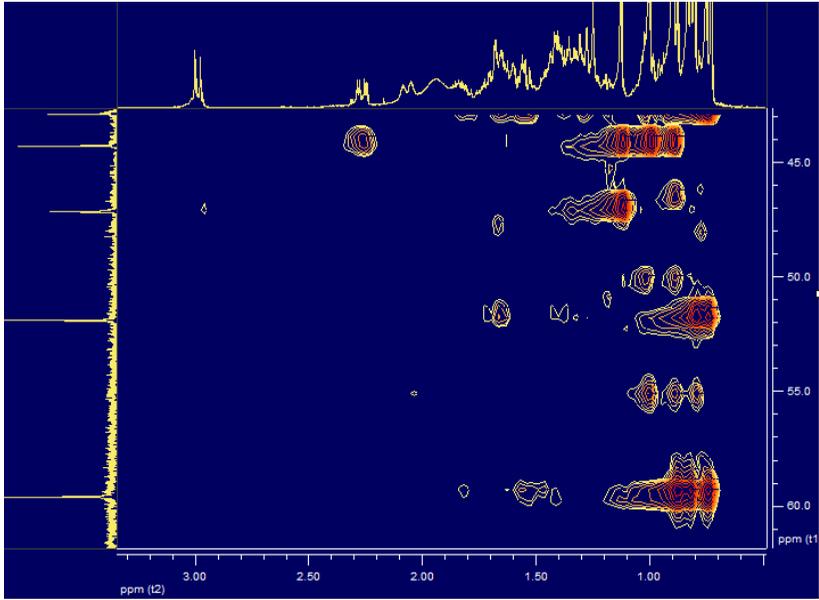
APÊNDICE B – Espectros de RNM COSY de derivado p-nitrobenzoidado de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol

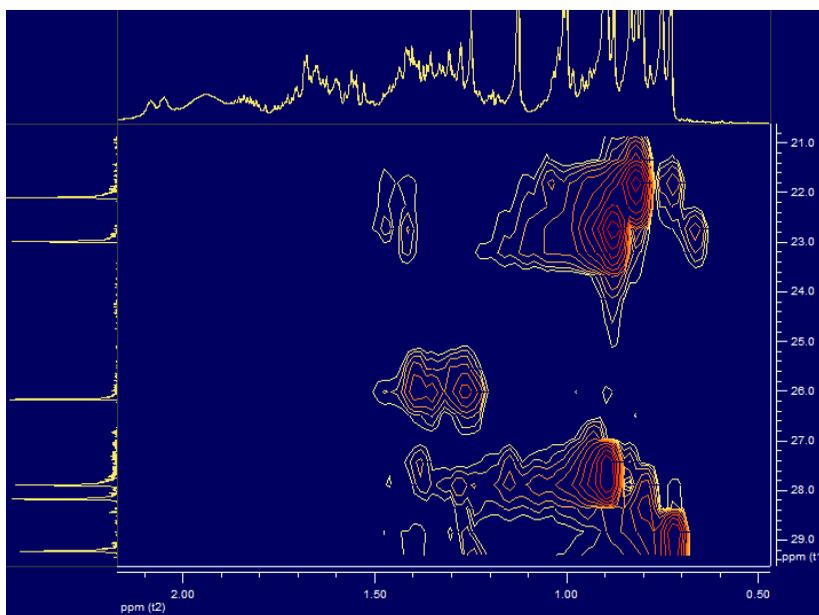
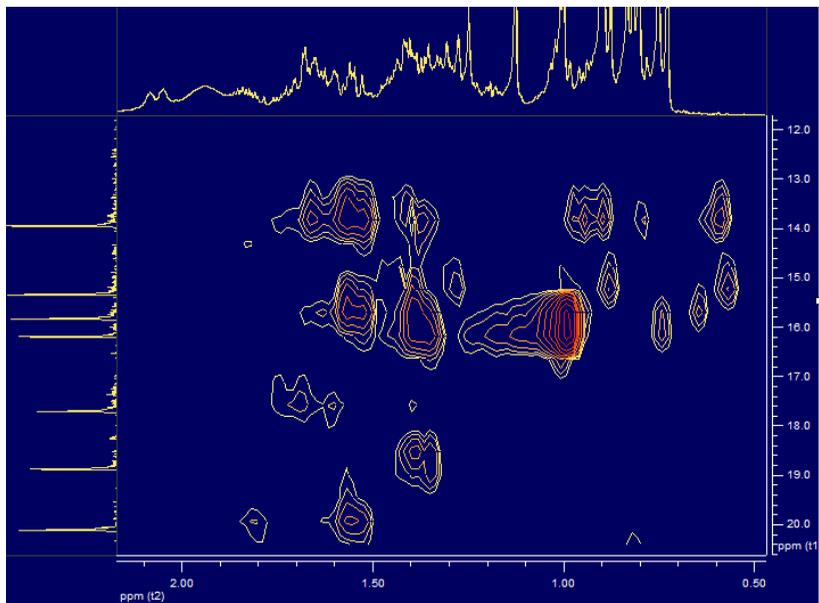


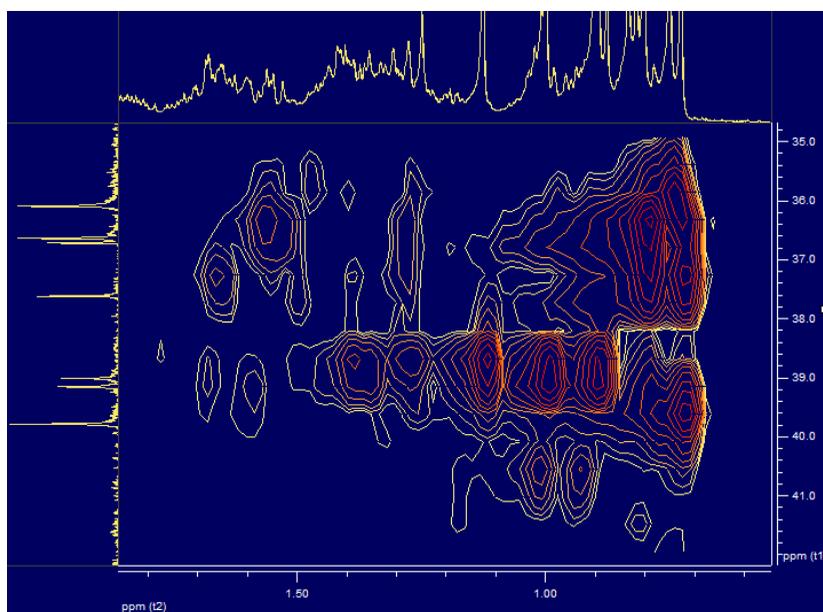
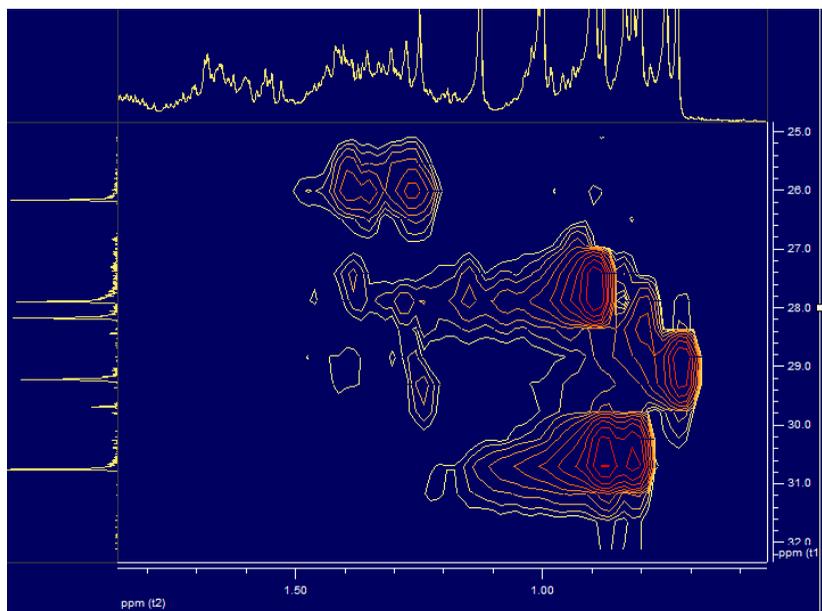
APÊNDICE C – Espectros de HMBC de derivado p-nitrobenzoilado de fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol

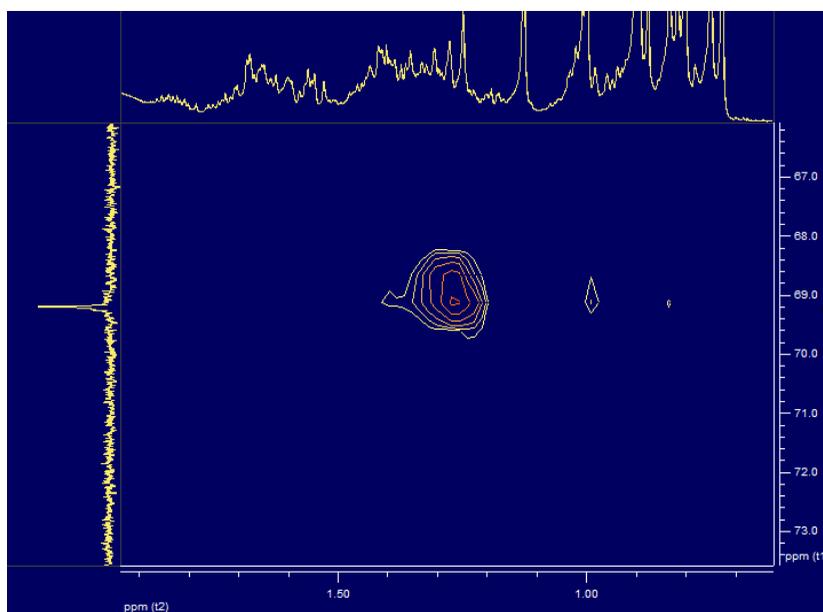
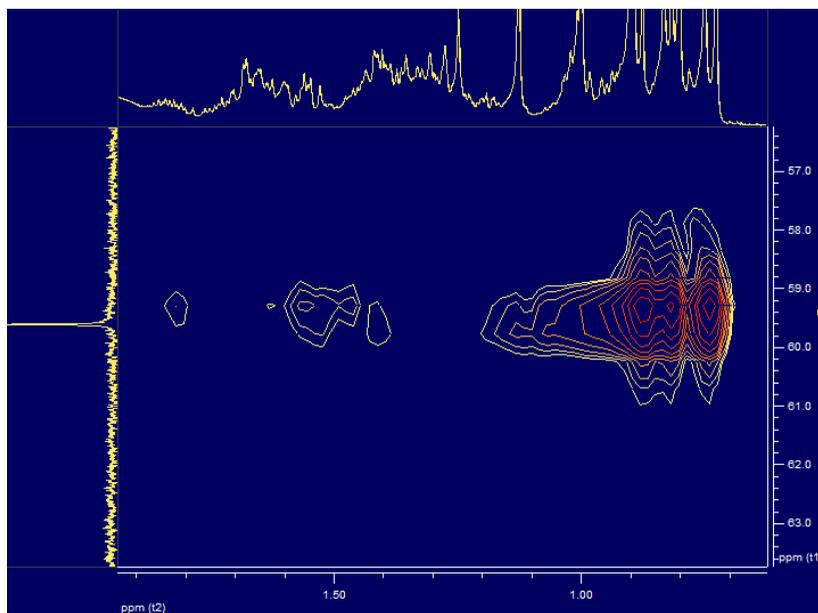


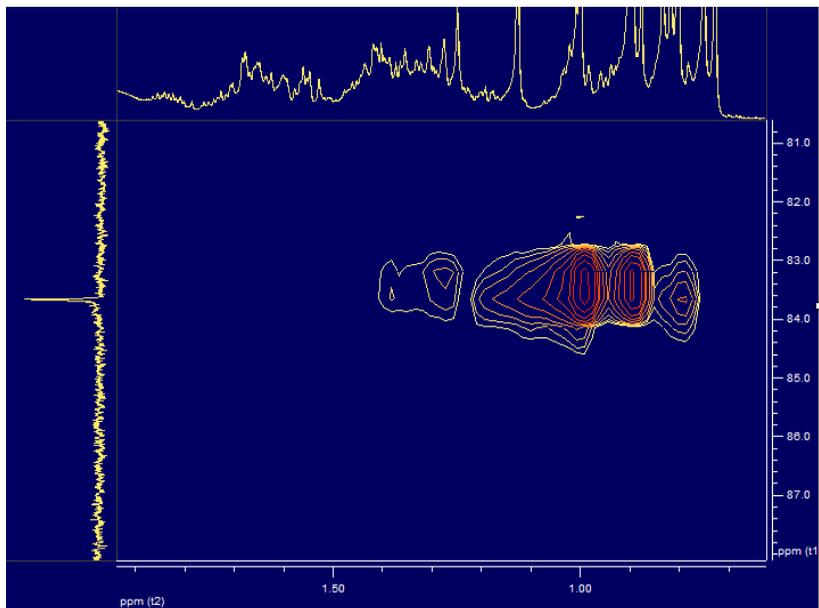












APÊNDICE D – Espectros de HMQC de derivado p-nitrobenzoidado do fern-9(11)-ene-2 α ,3 β -diol