

Delsi Altenhofen

**ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DE
ISOFLAVONAS NATURAIS COM POTENCIAL EFEITO
ANTIDIABÉTICO**

Dissertação submetido(a) ao Programa
de pós-graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dra. Fátima Regina
Mena Barreto Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos
Eduardo Blanco Linares

Florianópolis
2014

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

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

Altenhofen, Delsi

ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE AÇÃO DE ISOFLAVONAS
NATURAIS COM POTENCIAL EFEITO ANTIDIABÉTICO / Delsi

Altenhofen ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto
Silva ; coorientador, Carlos Eduardo Bianco Linares. -
Florianópolis, SC, 2014.

166 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Isoflavonas. 3. GLP-1. 4. Insulina. 5.
DPP-IV. I. Mena Barreto Silva, Fátima Regina. II. Bianco
Linares, Carlos Eduardo. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV.
Título.

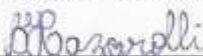
**“ESTUDO DO EFEITO E DO MECANISMO DE
AÇÃO DE ISOFLAVONAS COM POTENCIAL
EFEITO ANTIDIABÉTICO”**

POR

Delsi Altenhofen

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

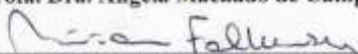
Banca Examinadora:



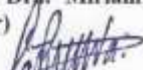
Profa. Dra. Luísa Helena Cazarolli (UFFS – Membro Titular)



Profa. Dra. Angela Machado de Campos (UFSC – Membro Titular)



Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro
Titular)



Profa. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva (UFSC –
Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 05 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profª. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva pela carinhosa recepção no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, pela paciência, oportunidade, confiança, incentivo e orientação durante o período do mestrado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Blanco Linares pelo incentivo e palavras de apoio desde a de iniciação científica e pela orientação durante a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do HTS - Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, que nunca negaram ajuda, sempre me apoiaram e por serem uma equipe de trabalho unida e maravilhosa. O meu sincero e afetuoso agradecimento aos colegas: Allisson, Ana Paula, Bárbara, Camila, Cauê, Danusa, Gabrielle, Marisa, Renata e Rui. Também agradeço aos colegas do Laboratório de Bioquímica Experimental e Sinalização Celular – LaBioSignal, pela amizade e bons momentos convividos.

Meu agradecimento especial à colega e amiga Gabrielle Da Luz, pela ajuda em todos os experimentos e momentos da realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio, tudo ficou mais fácil com tua companhia.

Aos colegas Allisson Jhonatan Castro e Marisa Jádna Frederico pelo ensinamento de todas as técnicas necessárias para a realização deste trabalho. Obrigada pela paciência e atenção de vocês.

Agradeço também à Ana Luiza Ludwig Moraes, Mayara Brich, alunas de iniciação científica que muito contribuíram para a realização deste trabalho, por serem pessoas empenhadas e comprometidas com o trabalho de todos. Também a Camila Pires Mendes por ter ajudado durante sua iniciação científica e em todos os momentos posteriores.

Meu especial agradecimento a minha família, por apoiar todas as minhas escolhas e decisões. Aos meus pais Anísia e Zeno, pela educação e por me ensinar a sempre lutar e buscar a realização dos meus sonhos. Aos meus irmãos, por sempre torcerem pela realização dos meus objetivos,

pelo carinho e apoio. Ich liebe euch: Anísia, Zeno, Greice, Joel e Helder.

Agradeço ao meu namorado Simão, por entender meus momentos distantes, pelo companheirismo e apoio incondicional. À sua família, por me incentivar, apoiar e compreender em todos os momentos.

Aos amigos de sempre, pelas palavras de apoio, pelas boas risadas e pela companhia.

Ao PGFAR - Programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade proporcionada. Também ao PGBQA - Programa de pós-graduação em Bioquímica, por disponibilizar a estrutura de laboratórios para a realização deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro, essencial para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A diabetes é uma doença crônica que afeta milhões de pessoas no mundo. As previsões para 2035 são de que a doença atinja mais de 592 milhões de pessoas. Estes dados revelam um importante problema de saúde pública e reforçam a necessidade de buscar por alternativas de tratamento preventivo e terapêutico. As plantas medicinais são uma importante fonte de compostos bioativos. Dentre estas, as isoflavonas despontam como uma classe de biomoléculas com importante atividade antidiabética, associadas principalmente a efeitos fitoestrógenos. Dessa forma, este estudo objetivou caracterizar a atividade anti-hiperglicêmica das isoflavonas PMA2.31 e PMA19, extraídas da fração acetato de etila de *Polygala molluginifolia*, bem como, elucidar os mecanismos pelos quais estas ações ocorrem. Para tanto, ambas as isoflavonas foram submetidas ao teste de tolerância oral à glicose, no qual, ratos Wistar machos receberam o tratamento (PMA2.31 e PMA19) isoladamente ou combinado com sitagliptina por gavagem e, 30 min após, uma sobrecarga de glicose foi administrada e a glicemia determinada aos 15, 30, 60 e 180 min subsequentes a esta administração. A avaliação da atividade das dissacaridases intestinais *in vivo* e o conteúdo de glicogênio hepático e muscular foi realizado no tempo 180 min. A atividade de dissacaridases também foi avaliada mediante incubação *in vitro*. Amostras de soro foram utilizadas para a dosagem de insulina e GLP-1 sérico. A atividade de DPP-IV (Dipeptidilpeptidase-IV) foi mensurada *in vitro*. A fim de identificar os mecanismos pelos quais as isoflavonas agem secretando insulina e/ou GLP-1, o efeito de PMA2.31 e/ou PMA19 foi avaliado no influxo de cálcio em fatias do intestino (cólon) e em ilhotas pancreáticas. Ainda, PMA2.31 e PMA19 foram incubadas na presença de albumina e glicose ou frutose, para determinação da glicação. Os resultados obtidos demonstraram a redução glicêmica induzida por PMA2.31 e PMA19 após 15 e 30 min, respectivamente. Ainda, PMA2.31 apresentou o efeito anti-hiperglicêmico potenciado quando combinado com sitagliptina. Ambas as isoflavonas aumentaram os níveis séricos de insulina além de PMA2.31 aumentar GLP-1 (*Glucagon Like Peptide-1*) sérico. O mecanismo pelo qual PMA2.31 atua nestes efeitos envolve a inibição parcial de DPP-IV e aumento da secreção de GLP-1 via ativação de PKC, uma vez que, houve um aumento significativo do influxo de cálcio em fatias de intestino e inibição deste estímulo quando utilizado inibidor de PKC (Proteína cinase C). Diferente de PMA2.31, PMA19 age

estimulando a secreção direta de insulina, devido ao incremento observado no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, sendo estas ações semelhantes às do estradiol e envolvem efeitos no canal de potássio dependente de ATP, canal de cálcio dependente de voltagem e ativação de PKA (Proteína cinase A). Além das ações supramencionadas, PMA2.31 aumentou o conteúdo de glicogênio hepático e assim como a fração acetato de etila, inibiu a atividade de maltase. A fração acetato de etila e as isoflavonas também diminuíram a glicação com albumina demonstrando um potencial efeito antidiabético. Ambas as isoflavonas não produziram alterações na concentração sérica de LDH, sugerindo serem atóxicas na concentração e tempo de tratamento avaliado.

Palavras-chave: Diabetes, glicemia, isoflavonas, insulina, GLP-1, DPP-

IV.

ABSTRACT

Diabetes is a chronic disease that affects approximately 382 million people worldwide, with predictions stating that this number will increase to 592 million in 2035. These data reveal an important public health problem and support the necessity to search for new targets for preventive and therapeutical treatment. Medicinal plants are an important source of bioactive compounds. Among those, the study of plants that contain isoflavones indicates these compounds as a class of biomolecules with important antidiabetic activity, mainly associated with phytoestrogens action. Therefore, this study aimed to characterize the anti-hyperglycemic activity of isoflavones PMA2.31 and PMA19, isolated from ethyl acetate fraction of *P. molluginifolia*, as well as to elucidate the mechanisms by which these actions occur. To this end, both isoflavones were submitted to oral glucose tolerance test, in which, male Wistar rats received the treatment (PMA2.31, PMA19) by gavage, with/without sitagliptin and, after 30 min, a glucose load was administered and blood glucose levels were determined at 15, 30, 60 and 180 min. The evaluation of *in vivo* intestinal disaccharidases activity, muscle and hepatic glycogen content was measured at 180 min. The disaccharidase activity was also performed by *in vitro* treatment. Serum samples were collected for insulin and GLP-1 dosage. *In vitro* DPP-IV activity was also measured. To investigate the mechanisms by which isoflavones act in insulin and/or GLP-1 secretion, PMA2.31 and/or PMA19 effect on calcium influx in pancreatic islets and intestine slices (colon) was evaluated. PMA2.31 and PMA19 were also tested for albumin glycation measurement. The results showed a significantly blood glucose reduction after treatment with PMA2.31 and PMA19 in 15 and 30 min, respectively. The effect of PMA2.31 was higher when co-administered with sitagliptin. Both isoflavones increased insulin serum levels and PMA2.31 was able to increase GLP-1 serum levels. The PMA2.31 effect on GLP-1 may involve an intermediate DPP-IV inhibition and augmented GLP-1 secretion via PKC activation, since there was a significant increase in calcium influx in intestine slices, and this effect was inhibited by co-incubation with a PKC inhibitor. On the other hand, PMA19 acts directly on insulin secretion due to its stimulus in pancreatic islets calcium influx, with a similar mechanism of action to estradiol, which involve effects on ATP-dependent potassium channel, voltage-gated calcium channel and PKA activation. In addition

to the above actions, PMA2.31 increased hepatic glycogen content and both this isoflavone and ethyl acetate fraction, inhibited maltase activity. The ethyl acetate fraction and both isoflavones also decreased albumin glycation, demonstrating a potential antidiabetic effect. Both isoflavones did not produce change in serum LDH, indicating they are non-toxic in the concentration and treatment period studied.

Key-words: Diabetes, glycemia, isoflavones, insulin, GLP-1, DPP-IV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da síntese da insulina.....	56
Figura 2– Liberação bifásica da insulina	58
Figura 3– Mecanismo de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas.....	60
Figura 4- Sinalização insulínica para a síntese de glicogênio	62
Figura 5 - Ação das dissacaridases intestinais sobre dissacarídeos.....	65
Figura 6 – Localização e distribuição das células enteroendócrinas do tipo K e L.	70
Figura 7- Mecanismos intracelulares de secreção de GLP-1	72
Figura 8– <i>Polygala molluginifolia</i>	87
Figura 9- Estruturas base das isoflavonas, flavonoides e estradiol	89
Figura 10 - Cromatograma de <i>P. molluginifolia</i>	99
Figura 11- Efeito agudo da fração acetato de etila na curva de tolerância a glicose	110
Figura 12 – Efeito agudo da fração acetato de etila no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	111
Figura 13 – Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vitro</i>	112
Figura 14 – Efeito agudo da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i>	113
Figura 15- Efeito da fração acetato de etila na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.	114
Figura 16 - Estrutura da isoflavona PMA2.31 (A) e estrutura base das isoflavonas (B).....	115

Figura 17- Efeito agudo de PMA2.31 na curva de tolerância a glicose	117
Figura 18 - Efeito de PMA2.31 na secreção de insulina	118
Figura 19 – Efeito Agudo de PMA2.31 e sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose.....	120
Figura 20 – Concentração sérica de GLP-1.....	121
Figura 21 – Efeito de PMA2.31 na atividade de DPP-IV	122
Figura 22– Curva de tempo de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e curva de dose-resposta de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon	124
Figura 23 – Envolvimento de canais de K^+ no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.....	126
Figura 24 - Envolvimento dos VDCC-L e do Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.	128
Figura 25 - Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.....	129
Figura 26 - Envolvimento da PKC no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.....	130
Figura 27 - Efeito de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.....	131
Figura 28 - Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	132
Figura 29 - Efeito PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vitro</i>	134
Figura 30 - Efeito de PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i>	135
Figura 31 - Efeito de PMA2.31 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	136

Figura 32 - Efeito de PMA2.31 na concentração de LDH.....	137
Figura 33 – Estrutura química das isoflavonas PMA19 (A), Genisteína (B), e estradiol (C)	138
Figura 34 - Efeito agudo de PMA19 na curva de tolerância a glicose	139
Figura 35 - Efeito de PMA19 na secreção de insulina.....	140
Figura 36 – Efeito Agudo de PMA19 e Sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose.....	141
Figura 37 – Curva de tempo de PMA19 (A), Estradiol (B) e concentração-resposta (C) de PMA19 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	143
Figura 38 - Curva de concentração de PMA19 no estímulo da captação ^{14}C -DG nas ilhotas pancreáticas	144
Figura 39 – Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA19 e Estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	146
Figura 40 – Envolvimento do VDCC-L no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	148
Figura 41 - Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	150
Figura 42 - Envolvimento de estoques de cálcio no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	152
Figura 43 - Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	153
Figura 44 - Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vitro</i>	155
Figura 45 - Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i>	156

Figura 46 - Efeito inibitório de PMA19 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	157
Figura 47 - Efeito de PMA19 na concentração de LDH	158
Figura 48 – Hipótese para mecanismo de ação de PMA2.31 no influxo de cálcio no intestino.....	174
Figura 49 - Hipótese para o mecanismo de ação de PMA19 no influxo de cálcio no intestino.....	175

LISTA DE ABREVIATURAS

^{14}C -DG	[U- ^{14}C]-2-deoxi-D-glicose
ADP	Adenosina bifosfato
AGE	Produto final de glicação avançada
Akt	Proteína cinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BAPTA-AM	<i>ácido 1,2-bis(2-aminofenóxi)-etano-N,N,N',N'-tetraacético tetrakis – quelante de cálcio intracelular</i>
BSA	Albumina bovina
CEUA	Comissão de ética no Uso de animais
DAG	Diacilglicerol
DPP-IV	Dipeptidilpeptidase IV
E-forbol	Ester de forbol
ER	Receptor de Estradiol
G-6-P	Glicose-6-fosfato
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
GPCR	Receptor acoplado a proteína-G
GSK-3	Glicogênio Sintase cinase 3
H-89	N-[2-(p-bromocianamilo)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
HEPES	Ácido etanosulfônico 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-yl]
HMIT	Transportador de H^+ ligado ao mio inositol
IDF	Federação Internacional de Diabetes
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfato

IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato receptor de insulina
K ⁺ _{ATP}	Canal de potássio dependente de ATP
KRb	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato
KRb-HEPES	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato adicionado de HEPES
PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA2.31	3',4'-dihidroxi-6'',6'',6''',6'''- tetrametilbis(pirano[2'',3''':5,6:2'',3''':7,8]isoflavona
PMA19	5,3',4'-trihidroxi-6'',6''- dimetilpirano[2'',3''':7,6]isoflavona
PMFA	<i>P. molluginifolia</i> – fração acetato de etila
PPAR-γ	Receptor gama ativado pelo proliferador de peroxissomo
PRS	Partícula de reconhecimento de sinal
RPM	Rotação por minuto
SGLT-1	Proteína co-transportadora de Na ⁺ /glicose 1
ST	Cloreto de esteroilcarnitina
VDCC-L	Canal de Ca ²⁺ dependentes de voltagem do tipo L
MCI	Micro Curie

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	53
1.1 Insulina: histórico, síntese, secreção e vias de sinalização	53
1.1.1 Histórico.....	53
1.1.2 Síntese da insulina.....	53
1.1.3 Secreção de insulina.....	56
1.1.4 Sinalização insulínica.....	60
1.2 Homeostasia da glicose.....	62
1.2.1 Absorção de glicose.....	62
1.2.2 Transporte de glicose nos tecidos.....	65
1.2.3 Eixo êntero-insular e homeostasia da glicose.....	66
1.2.3.1 Biossíntese de GLP-1.....	67
1.2.3.2 Secreção de GLP-1.....	69
1.2.3.3 Inativação de GLP-1.....	72
1.2.3.4 Secreção de insulina mediada por GLP-1 e efeitos em tecidos-alvo.....	72
1.3 Manutenção da homeostasia da glicose.....	74
1.4 Diabetes.....	75
1.5 Complicações do diabetes e AGES.....	78
1.6 Tratamento da diabetes.....	81
1.6.1 Plantas medicinais como fonte terapêutica.....	84
1.7 Isoflavonas.....	87
2. JUSTIFICATIVA.....	90
3. OBJETIVOS.....	93
3.1 Objetivo Geral.....	93

3.2 Objetivos específicos:	93
4. METODOLOGIA	95
4.1 Materiais	95
4.2.1 Preparação do extrato bruto.....	96
4.2.2 Extração líquido-líquido.....	96
4.2.3 Isolamento e purificação dos compostos.....	96
4.3 Animais	98
4.4 Determinação da curva de tolerância oral à glicose, insulina e de GLP-1 sérico	99
4.4.1 Curva de tolerância oral à glicose.....	99
4.4.2 Determinação da insulina sérica.....	100
4.4.3 Determinação do GLP-1 sérico.....	100
4.5 Determinação da atividade de DPP-IV in vitro	101
4.6 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fatias do cólon intestinal	101
4.7 Isolamento das ilhotas pancreáticas	102
4.8 Captação de ^{14}C-glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos	103
4.9 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos	104
4.10 Determinação do conteúdo de glicogênio	104
4.11 Determinação da atividade das dissacaridases intestinais in vivo e in vitro	105
4.12 Determinação da atividade anti-glicação	106
4.13 Análises estatísticas	106
5. RESULTADOS	108

5.1 Resultados Parte 1 – Efeito anti-hiperglicêmico da fração acetato de etila (PMFA) de <i>Polygala molluginifolia</i>.....	108
5.1.1 Efeito da fração acetato de etila na curva de tolerância oral à glicose e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	108
5.1.2 Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais.....	110
5.1.3 Efeito da fração acetato de etila na formação de AGES.....	112
5.2 Parte 2 - Estudo do efeito da isoflavona PMA 2.31 na secreção de insulina, GLP-1 e na atividade da DPP-IV.....	114
5.2.1 Efeito agudo de PMA2.31 na curva de tolerância oral à glicose.....	115
5.2.2 Efeito de PMA2.31 na secreção de insulina.....	117
5.2.3 Efeito de PMA2.31 e sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose.....	117
5.2.4 Efeito de PMA2.31 na secreção de GLP-1.....	119
5.2.5 Efeito de PMA2.31 na atividade de DPP-IV.....	120
5.2.6. Estudo do mecanismo de ação da isoflavona PMA2.31 na secreção de GLP-1 no intestino.....	121
5.2.6.1 Curva curva de tempo e curva dose-resposta de PMA2.31 no influxo cálcio no cólon.....	122
5.2.6.2 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon.....	124

5.2.6.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e cálcio interno no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.....	126
5.2.6.4 Envolvimento da PKC no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.....	128
5.2.6.5 Envolvimento de PMA2.31 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.....	130
5.2.7 Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	131
5.2.8 Efeito de PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	132
5.2.9 Efeito inibitório de PMA2.31 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	134
5.2.10 Efeito de PMA2.31 na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH).....	135
5.3 Parte 3 – Papel da isoflavona PMA19 na secreção de insulina.....	136
5.3.1 Efeito agudo de PMA19 e estradiol na curva de tolerância oral à glicose.....	137
5.3.2 Efeito de PMA19 na secreção de insulina.....	138
5.3.3 Efeito de PMA19 combinado com sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose.....	139
5.3.4 Efeito de PMA19 na curva de dose-resposta e de tempo em ilhotas pancreáticas.....	141
5.3.5 Efeito da PMA19 na captação de ^{14}C -glicose em ilhotas pancreáticas de rato <i>in vitro</i>	142

5.3.6 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA19 e Estradiol no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.....	143
5.3.7 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo $^{45}Ca^{2+}$...	146
5.3.8 Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo $^{45}Ca^{2+}$	148
5.3.9 Envolvimento do cálcio dos estoques no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}Ca^{2+}$	150
5.3.10 Efeito agudo de PMA19 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	152
5.3.11 Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	153
5.3.12 Efeito de PMA19 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	155
5.3.13 Efeito de PMA19 na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH).....	156
6. DISCUSSÃO.....	158
7. CONCLUSÕES.....	172
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	176

1. INTRODUÇÃO

1.1 Insulina: histórico, síntese, secreção e vias de sinalização

1.1.1 Histórico

A insulina foi uma das descobertas mais relevantes da medicina. Embora vários relatos anteriores à data de 1921, descreviam a existência de uma substância intimamente associada à causa da diabetes, somente neste ano, Frederick Banting e Charles Best comprovaram a existência da insulina. No entanto, a utilização de um extrato purificado de insulina bovina, somente foi realizada mais tarde. Em 1923 James Collip e John Mcleod receberam o prêmio Nobel, devido aos avanços na compreensão da diabetes, estabelecido a partir do tratamento de pacientes com extrato purificado de insulina (BILOUS; DONNELLY, 2010, p. 5-7).

Posteriormente, em 1955, Frederick Sanger descreveu a sequência de aminoácidos da insulina e em 1969, Dorothy Hodking propôs a estrutura tridimensional da mesma. No entanto, somente entre 1963 -1966, a insulina humana foi primeiramente sintetizada. A partir de então, os mecanismos de síntese puderam ser compreendidos (BILOUS; DONNELLY, 2010, p. 5-7).

1.1.2 Síntese da insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico formado por 51 aminoácidos, distribuídos em duas cadeias (A e B) interligadas por pontes dissulfeto. A síntese (Figura 1) ocorre nas células β pancreáticas das ilhotas de Langerhans. O mecanismo de síntese é desencadeado por múltiplos fatores, porém o metabolismo da glicose é o principal

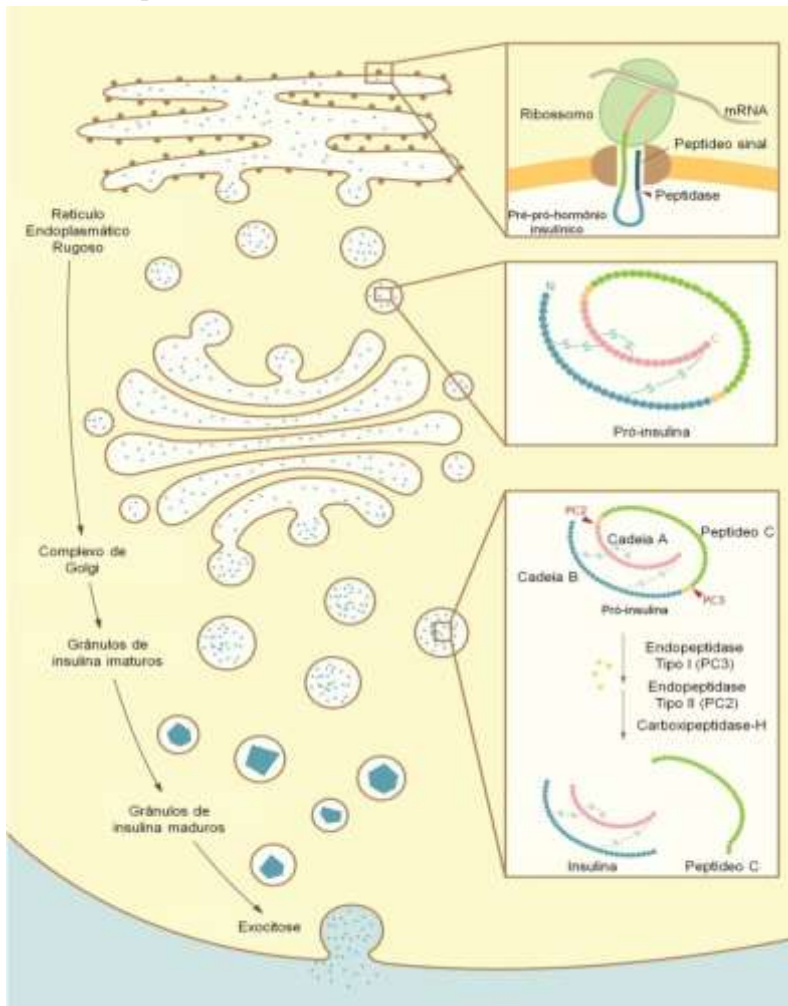
estímulo para transcrição do hormônio. (STEINER; OYER, 1967; FU; GILBERT; LIU, 2013).

É no retículo endoplasmático rugoso das células β pancreáticas que ocorre a síntese da insulina. O gene da insulina codifica uma sequência de 110 aminoácidos, nomeada pré-pró-insulina. Este pré-pró-hormônio contém um peptídeo sinal que é reconhecido e transportado por uma partícula de reconhecimento de sinal (PRS) até o lúmen do retículo endoplasmático, através de canal específico de condução de peptídeos. Neste momento, peptidases realizam a clivagem do peptídeo sinal, gerando a pró-insulina. Na sequência ocorre o processo de maturação tridimensional da insulina, que envolve o enovelamento da proteína e formação de três pontes dissulfeto, formando duas cadeias (A e B), ligadas por um peptídeo C (STEINER; OYER, 1967; FU; GILBERT; LIU, 2013).

A condução da pró-insulina ao complexo de Golgi inicia o processo final de maturação. Dentro de vesículas imaturas, ocorre a proteólise, que libera o peptídeo C da cadeia A e B. Forma-se então a insulina, composta por 51 aminoácidos dispostos em duas cadeias polipeptídicas, A e B, unidas por ligações dissulfeto, apresentando, respectivamente, 21 e 30 resíduos de aminoácidos (Figura 1) (STEINER; OYER, 1967; HUANG; ARVAN, 1995; STEINER, 2011; FU; GILBERT; LIU, 2013).

Ainda, nas vesículas, a insulina é ligada ao zinco. Cada molécula de Zn^{+2} comporta 6 moléculas de insulina, formando um hexâmero de insulina. A presença do zinco nas vesículas também é descrita como essencial no processo de maturação do hormônio. (CHIMIENTI; FAVIER; SEVE, 2005; DUNN, 2005).

Figura 1 – Etapas da síntese da insulina



Durante o processo de transferência do pré-pró-hormônio, ocorre a clivagem da sequência sinal, por uma peptidase sinal, liberando a pró-insulina. No complexo de Golgi a pró-insulina é internalizada em vesículas, onde sofre a maturação final. Primeiramente a pró-insulina sofre a ação da endopeptidase do tipo I (PC3), que cliva na região dos aminoácidos Arg³¹ Arg³². Posteriormente a endopeptidase tipo II (PC2) cliva o pró-hormônio em Lys⁶⁴ e Arg⁶⁵. A carboxipeptidase-H age posteriormente clivando estes dipeptídeos em peptídeos

livres. Este processo é essencial para formar a insulina biologicamente ativa separada do peptídeo C. Adaptado de: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin_biosynthesis.svg. Acesso em: 25/10/14.

1.1.3 Secreção de insulina

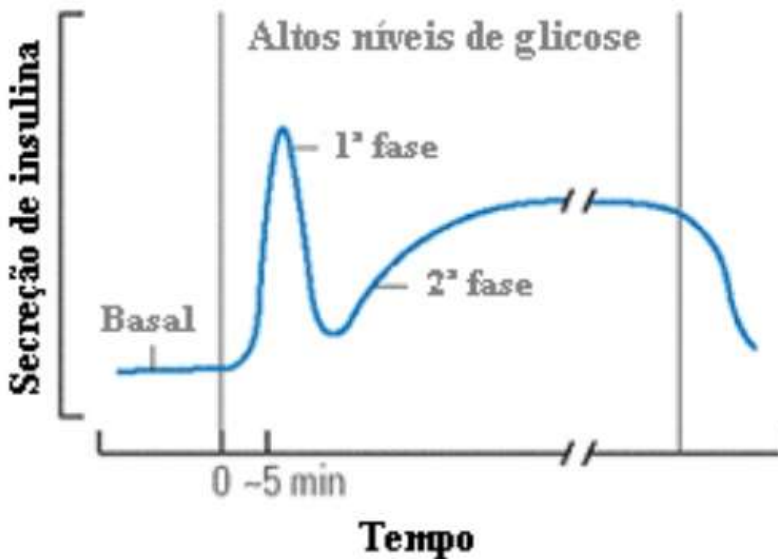
Os grânulos de insulina sintetizados permanecem armazenados em um pool intracelular, aguardando um sinal para fundir-se a membrana e iniciar o processo de exocitose. Existem múltiplos ativadores da secreção de insulina, como aminoácidos e alguns hormônios gastrointestinais. Também, as ilhotas pancreáticas são inervadas pelo sistema nervoso autônomo. Este controle neuronal auxilia na liberação coordenada de insulina após a ingestão de alimentos. No entanto, a glicose é o principal sensibilizador da secreção de insulina (HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003).

Um aumento abrupto de glicose, como ocorre após uma refeição, atua como um mecanismo de sensibilização da célula β -pancreática, promovendo a secreção de insulina com característica bifásica. A primeira fase é transitória e rápida, com duração de 4 a 10 min. Nesta fase, os grânulos de insulina ancorados à membrana, são liberados a partir do *pool* ou estoque de liberação rápida (Figura 2). Esta primeira fase também é conhecida como desencadeadora, e tem o objetivo de direcionar a utilização da glicose da dieta, bem como inibir a produção hepática de glicose (DEL PRATO; TIENGO, 2001).

A segunda fase é conhecida como amplificadora ou de manutenção e tem uma durabilidade estendida. Nesta, os sinais para secreção de insulina são amplificados, levando ao recrutamento de vesículas localizadas no citoplasma da célula β -pancreática e ativação da

síntese do próprio hormônio. Esta fase tem por objetivo manter os níveis glicêmicos basais (Fig. 2) (HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003).

Figura 2– Liberação bifásica da insulina



A liberação de insulina ocorre em duas fases. A primeira (4 a 10 min) resulta da fusão de vesícula de insulina ancoradas a membranas das células β - pancreáticas e tem o objetivo de estimular a utilização de glicose, enquanto inibe a produção hepática de glicose. A segunda é a fase de manutenção e objetiva manter os níveis basais de glicose. **Fonte:** Adaptado de: http://www.emv.fmb.unesp.br/aulas_on_line/Endocrinologia/diabetes_mellitus/fisiopatologia.asp. Acesso em: 25/10/14.

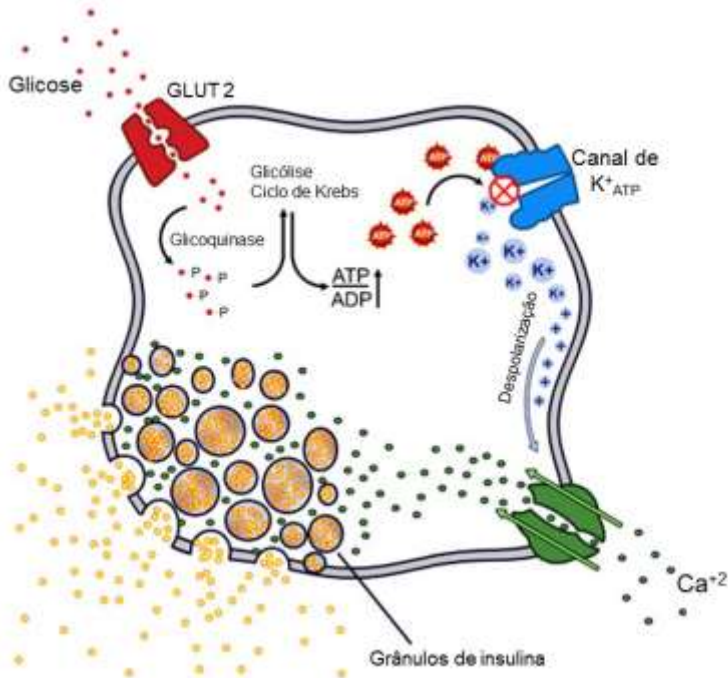
Porém, para que a glicose estimule a secreção de insulina, é necessário que esta seja transportada para o espaço intracelular da célula β -pancreática (Fig. 3). Este transporte é realizado pelo transportador de glicose GLUT2 em ratos e GLUT1 em humanos. GLUT2 possui uma

elevada capacidade para transportar a glicose ($K_m = 15$ e 20 mmol/L) (RORSMAN; BRAUN, 2013). Esta característica permite um rápido e eficiente transporte da glicose após a elevação pós-prandial da glicemia a favor de gradiente de concentração. No interior celular, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela glicoquinase (hexocinase IV $K_m = 6$ a 11 mmol/L) ou pela hexocinase I ($K_m < 0,1$ mmol/L). Estas diferem em relação à afinidade pela glicose, sendo a hexocinase I, rapidamente inibida por glicose-6-fosfato, por ser de alta afinidade. Dessa forma, a glicoquinase que possui baixa afinidade, assume o papel principal na fosforilação da glicose. Este mecanismo permite um controle homeostático, com ativação do metabolismo em diferentes concentrações fisiológicas de glicose (MATSCHINSKY, 1996; RORSMAN; BRAUN, 2013).

A glicose-6-fosfato segue a via glicolítica e posteriormente a geração de ATP mitocondrial. O aumento intracelular de ATP em detrimento de ADP favorece o evento de fechamento de canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}^+). O aprisionamento de potássio intracelular induzido pelo fechamento de K_{ATP}^+ , gera uma diferença de potencial e desencadeia a despolarização celular. Esta oscilação de voltagem ocasiona a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, permitindo o influxo de cálcio. O aumento de cálcio intracelular promove a ativação de um sistema de mobilização das vesículas de insulina, resultando na fusão das mesmas à membrana e sequente processo de liberação da insulina. Esta via de secreção de insulina é classicamente ativada por glicose. No entanto, nutrientes, hormônios ou outros agentes insulíntricos podem ativar distintas

vias de sinalização que culminam na secreção de insulina (KOMATSU et al., 2013).

Figura 3– Mecanismo de secreção de insulina pelas células β -pancreáticas



A glicose adentra a célula via GLUT2 e seu metabolismo gera aumento da relação ATP/ADP. O fechamento dos canais de K⁺ATP pelo ATP, gera a despolarização e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O influxo de cálcio é o estímulo necessário para a fusão de vesículas e liberação de insulina. Fonte: http://www.betacell.org/content/articleview/article_id/1/ Acesso em: 25/10/14.

1.1.4 Sinalização insulínica

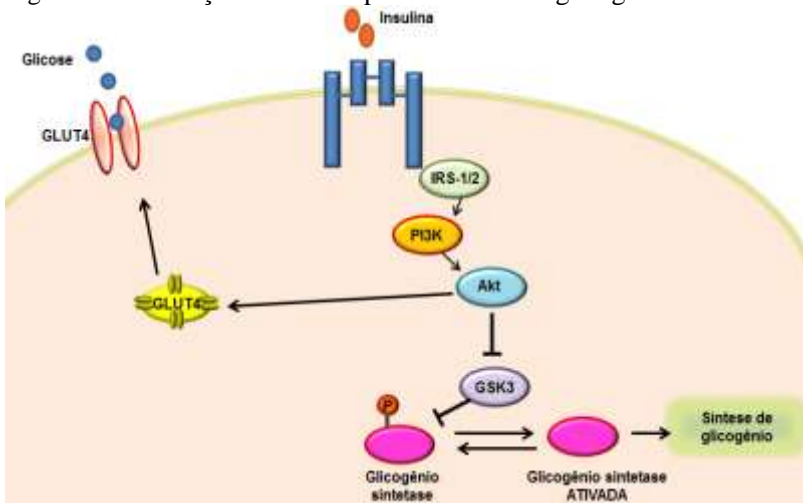
Após ser liberada na corrente sanguínea, a insulina age em múltiplos alvos envolvidos na manutenção da homeostasia da glicose. Esta ação inicia com a interação ao receptor de insulina (RI) situado em órgãos-alvo. O RI pertence a uma família de receptores tirosina cinase, com atividade cinase intrínseca. O receptor é uma proteína heterotetramérica transmembranar, formada por duas subunidades extracelulares α , com um sítio alostérico no qual a insulina interage. Esta interação conduz à ativação da atividade de tirosina cinase das subunidades β intracelulares e a consequente autofosforilação do receptor em resíduos de tirosina específicos (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

Uma vez ativado, o receptor da insulina torna-se apto a atuar em outros substratos intracelulares, desencadeando a ativação de vias de sinalização que culminam em eventos que envolvem a captação de glicose nos tecidos insulino-dependentes, síntese de glicogênio e de ácidos graxos livres, síntese de proteínas, promoção de crescimento e diferenciação celular, além da lipólise (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006).

O sinal para a síntese de glicogênio (Fig. 4), por exemplo, inicia com a fosforilação e ativação do substrato do receptor de insulina (IRS). Os IRS pertencem a uma família de proteínas (IRS1-4) que regulam a fase inicial de transdução do sinal insulínico. IRS1 envolve a regulação do sinal insulínico muscular e ambos IRS1 e 2, desempenham esta função no fígado. Quando IRS é fosforilado, o mesmo adquire a capacidade de criar sítios de reconhecimento para ativação de outras

proteínas, como p85 e p110, respectivas subunidades regulatória e catalítica da proteína PI3-K. Esta etapa permite a ativação do eixo PI3K-Akt (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase/ proteína cinase B). A ativação de Akt inibe GSK3 (Glicogênio sintase cinase 3), uma proteína inibidora da enzima glicogênio sintetase. Portanto, através deste eixo, esta enzima permanece ativada para síntese de glicogênio hepático e muscular. A ativação de PI3-K/Akt também é essencial para a translocação do transportador de glicose GLUT4 para a membrana das células musculares e dos adipócitos, evento primordial para a captação de glicose nestes tecidos (SALTIEL; KAHN, 2001; COHEN; GOEDERT, 2004; COHEN, 2006).

Figura 4- Sinalização insulínica para a síntese de glicogênio



A síntese de glicogênio inicia com a ativação de IRS1/2. Esta proteína cria sítios de ativação de outras proteínas, culminando com a ativação de Akt. Akt inibe GSK3, permitindo que a enzima glicogênio sintetase seja ativada para a síntese de glicogênio. Adaptado de Philip Cohen & Michel Goedert, 2004.

1.2 Homeostasia da glicose

1.2.1 Absorção de glicose

Os carboidratos são ingeridos principalmente na forma de polissacarídeos. No entanto, para que ocorra a absorção destes no intestino, é necessária a ação de enzimas digestivas que reduzem estes polissacarídeos em unidades mais simples, como os dissacarídeos (SHARMA; SIVAKAMI, 1998).

No intestino, os dissacarídeos são submetidos a um segundo processo digestivo que envolve a ação das dissacaridases intestinais. Estas reduzem os dissacarídeos em monossacarídeos, forma, na qual ocorre a absorção dos carboidratos. (SHARMA; SIVAKAMI, 1998).

As dissacaridases, também conhecidas como glicosidades, estão presentes na membrana dos enterócitos, células que formam o epitélio intestinal. As glicosidades são divididas em duas classes, as α e β glicosidades. As α -glicosidades atuam hidrolisando a ligação α -glicosídica dos dissacarídeos conectados por ligações do tipo α . Estão incluídas nesta classe as enzimas amilase, trealose-6-fosfato hidrolase, sacarase e maltase. A maltase e a sacarase são as mais estudadas como alvo terapêutico da diabetes, pois hidrolisam respectivamente a maltose, liberando duas unidades de glicose para serem absorvidas e sacarose, liberando frutose e glicose (Fig. 5) (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

Ainda, as β – glicosidades incluem β glicosidade, β galactosidase ou lactase, β glicuronidase, e β D-acetil-hexosaminidase. As β glicosidades atuam em sacarídeos com ligação β -glicosídica. A lactase hidrolisa a ligação β da lactose, liberando unidades de glicose e

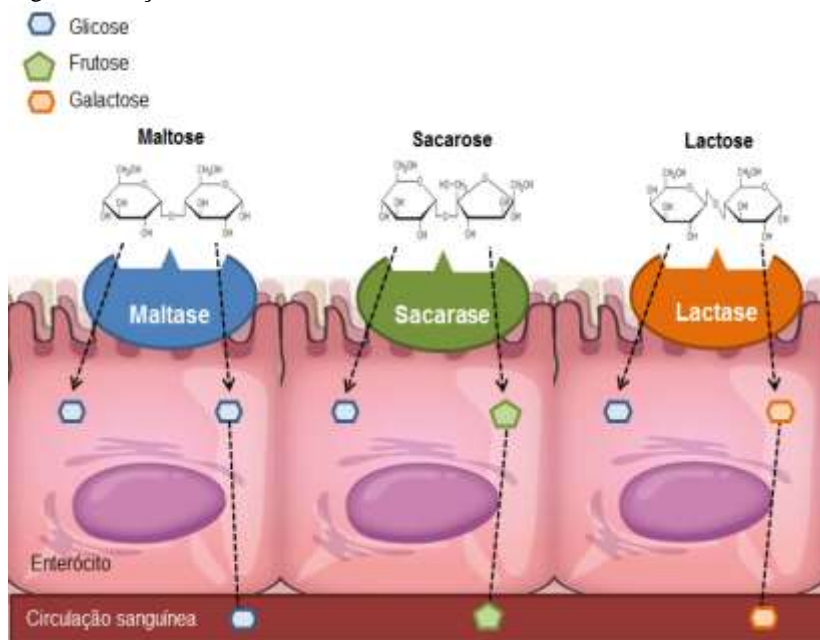
galactose (Fig 5). A acarbose é um medicamento que se encontra disponível no mercado atuando como um adjuvante no tratamento da diabetes. A acarbose atua inibindo a enzima maltase e sacarase e, portanto, impede a absorção de glicose. Esta ação se restringe às α -glicosidases e, a não ação sobre a lactase, torna esta terapia vantajosa, por não produzir uma intolerância à lactose no paciente (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

Após a clivagem destes dissacarídeos, os monossacarídeos formados serão transportados para o interior do enterócito. Este transporte é realizado por transportadores específicos. No intestino, a glicose pode adentrar a célula de duas maneiras. Primeiramente através de transportadores de difusão facilitada. Estes transportadores pertencem a uma grande família, conhecida como GLUTs, responsáveis pela absorção de glicose em diversos tecidos. No enterócito, a absorção facilitada de glicose é mediada por GLUT2. O GLUT2 possui uma baixa afinidade por glicose, porém com K_m maior. Estas características permitem o transporte eficiente de glicose após uma refeição, por exemplo, quando as concentrações da mesma se elevam. Ainda, GLUT2, além de ser responsável pelo transporte de glicose no enterócito para a corrente sanguínea, pode ser translocado para a membrana, outro fator que permite a absorção de glicose pós-prandial (KELLETT; BROT-LAROCHE, 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009; SILVA et al., 2013).

Também atuam no transporte de glicose os transportadores de glicose dependentes de sódio, pertencentes à família SLC5A. Os membros desta família são denominados de SGLTs. SGLT1 pode ser encontrado no intestino, participando do transporte ativo de glicose. Este

transportador possui uma alta afinidade por glicose, porém baixa capacidade de transporte (K_m menor), o que permite a manutenção da glicemia em baixas concentrações de glicose. O SGLT-1 possui uma região de ligação ao sódio. A ligação do sódio permite o acesso do receptor à glicose. São necessárias duas unidades de sódio para cada glicose, transportados ambos na mesma direção. Este gradiente de sódio é gerado pela ATPase- Na^+/K^+ , localizada na membrana basolateral (KELLETT; BROT-LAROCHE, 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009; SILVA et al., 2013).

Figura 5 - Ação das dissacaridasas intestinais sobre dissacarídeos



A absorção de dissacarídeos no intestino ocorre pela ação da dissacaridasas. A hidrólise da maltose pela enzima maltase libera duas moléculas de glicose disponíveis para absorção. A sacarase age sobre a sacarose liberando uma molécula de glicose e frutose. A lactose sofre ação da lactase liberando uma unidade de glicose e uma de galactose. Nesta forma de monossacarídeos estes

carboidratos são absorvidos pelos enterócitos através de transportadores específicos.

1.2.2 Transporte de glicose nos tecidos

Assim como no intestino, o transporte de glicose para outros tecidos é realizado através da família dos GLUTs e SGLTs. Além de SGLT1, responsável pelo transporte ativo de glicose no intestino, são conhecidos mais cinco transportadores desta família, porém apenas 3 com funções de transporte claramente estabelecidas. O segundo transportador, ou SGLT2, é encontrado no túbulo proximal dos rins, onde realiza a reabsorção renal de glicose. SGLT3 é expresso na musculatura lisa e esquelética e acredita-se que também desempenha alguma função nos neurônios do sistema nervoso entérico (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010).

O transporte de glicose também é realizado pela família dos GLUTs. São conhecidos 14 membros desta família. Esta família está subdividida em classes. A classe I compreende GLUTs 1-4 e GLUT14. GLUT1 está presente nos eritrócitos e células endoteliais e em células β humanas. GLUT2 está presente no enterócitos e predominantemente em células β de ratos. GLUT3 é responsável pela captação de glicose no cérebro, tecido muscular e coração. O GLUT4 é o transportador de glicose responsivo à insulina. O mesmo é expresso nos tecidos insulino-dependentes, como músculo e tecido adiposo. (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010; SILVA et al., 2013).

A segunda classe de transportadores GLUTs é representada por GLUT5, GLUT7, GLUT9 e GLUT11. GLUT5 transporta frutose no intestino e é expresso também em testículos e rins. GLUT7 também está presente no intestino, cólon, testículos e próstata. GLUT9 é encontrado nos rins e fígado. GLUT11 é o transportador em tecidos com baixa afinidade por glicose e também pode transportar frutose. A classe III corresponde aos GLUTs 6, 8, 10 e 12 e ao transportador de H⁺ ligado ao mio inositol (HMIT). GLUT6 é também expresso no cérebro leucócitos e vesícula biliar, GLUT8 nos testículos e GLUT10 no fígado e pâncreas, enquanto que, GLUT12 pode ser encontrado no coração e próstata. O HMIT é expresso no cérebro (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010; SILVA et al., 2013).

1.2.3 Eixo êntero-insular e homeostasia da glicose

Após a ingesta alimentar várias respostas fisiológicas ocorrem no sentido de utilizar e armazenar a glicose provinda da dieta. A insulina tem um papel central nestas funções. No entanto, outros sinais endócrinos e neurais são de extrema importância na homeostasia da glicose. Dentre estes, o eixo êntero-insular constitui um importante sistema mediado pela ação das incretinas, que une o trato intestinal e pâncreas em um sistema intimamente envolvido na manutenção da homeostasia da glicose (DRUCKER, 2006; RANGANATH, 2008).

As incretinas são hormônios secretados pelo intestino em resposta a ingesta de nutrientes. Atualmente, as incretinais mais estudadas são, o GLP-1 (*Glucagon like peptide 1*) e GIP (Polipeptídeo insulino-trópico dependente de glicose). Ambos agem em diversos tecidos através de

receptores específicos, acoplados a proteína G, conhecidos como GPCRs. Receptores para GIP podem ser encontrados nas células β -pancreáticas, tecido adiposo, ossos e cérebro. Já os receptores para GLP-1, além de serem expressos nas células α e β – pancreáticas, também podem ser encontrados no sistema nervoso central e periférico, coração, rins, pulmões e no próprio trato gastrointestinal (PHILLIPS; PRINS, 2011).

Esta ampla distribuição tecidual medeia as diversas ações fisiológicas destes hormônios. Uma das principais funções envolvem os efeitos insulínotropicos. Ambos aumentam a secreção e biossíntese de insulina, elevam a proliferação e inibem a apoptose de células β -pancreáticas. Ainda, GLP-1 inibe o esvaziamento gástrico e a ingestão alimentar, bem como, reduz a produção endógena de glicose. O GIP também atua sobre o metabolismo lipídico, aumentando a síntese de ácidos graxos e a atividade da lipoproteína lipase, que aumenta a incorporação de ácidos graxos no adipócito (PHILLIPS; PRINS, 2011).

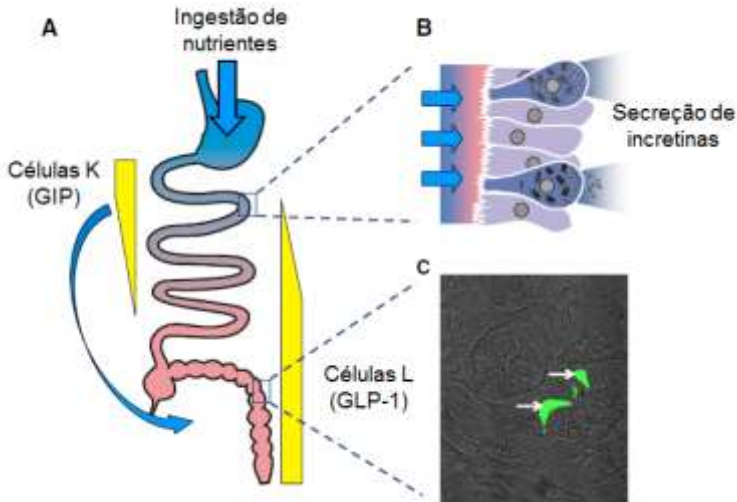
1.2.3.1 Biossíntese de GLP-1

As incretinas são essencialmente sintetizadas pelas células enteroendócrinas intestinais. Existem vários tipos de células enteroendócrinas, baseadas em características específicas como morfologia e o hormônio secretado. Entre as mais estudadas estão as células L e K, que produzem respectivamente o GLP-1 e GIP. As células L e K mantêm contato com o lúmen intestinal através de uma porção apical e através de outra porção basolateral que mantêm contato com a circulação sanguínea. Esta característica classifica as células K e

L como um subtipo de células enteroendócrinas conhecidas como “open-type”, pois, esta característica permite que elas sejam sensibilizadas por nutrientes em contato com a membrana apical ou por outros componentes presentes na circulação sanguínea, através da porção basolateral, como sinais neuronais. As células K se localizam predominantemente na porção inicial do intestino, ou duodeno. No entanto, as células L se localizam principalmente nas porções finais do intestino, no íleo e cólon (Fig 6) (DRUCKER, 2006; RANGANATH, 2008).

O GLP-1 é formado a partir do gene do proglucagon. O GLP-1 é primeiramente formado por 37 aminoácidos (GLP-1 (1-37)), com uma glicina ligada ao carbono terminal. Posteriormente o mesmo sofre clivagem, perdendo 6 aminoácidos na porção N-terminal, formando o GLP-1 ativo (GLP-1 (7-37)). O GLP-1 ativo também pode sofrer uma amidação na glicina terminal formando uma segunda forma de GLP-1 (GLP-1 (6-37)). A última é a forma predominante na circulação sanguínea, embora ambas apresentem potenciais efeitos insulíntrópicos. (DRUCKER, 2006; RANGANATH, 2008).

Figura 6 – Localização e distribuição das células enteroendócrinas do tipo K e L.



(A) As células K se localizam predominantemente nas primeiras porções do intestino, enquanto as células L se localizam nas porções distais (C). Ambas são subtipos de células chamadas “open-type”, com um porção voltada para o lúmen e outra em contato com a circulação, o que permite que as mesmas sejam sensibilizadas a partir da porção apical e basolateral. Fonte: (DIAKOIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012).

1.2.3.2 Secreção de GLP-1

De maneira semelhante à insulina, a secreção de GLP-1 também é bifásica, embora as fases ocorram em tempos diferenciados. O estímulo para a secreção de GLP-1 inicia após 10 – 15 min após a refeição e perdura até aproximadamente 30 a 60 min. A segunda fase se inicia em aproximadamente 60 min e perdura até os 120 min. Da mesma forma, a secreção de GLP-1 parece envolver mecanismos semelhantes à

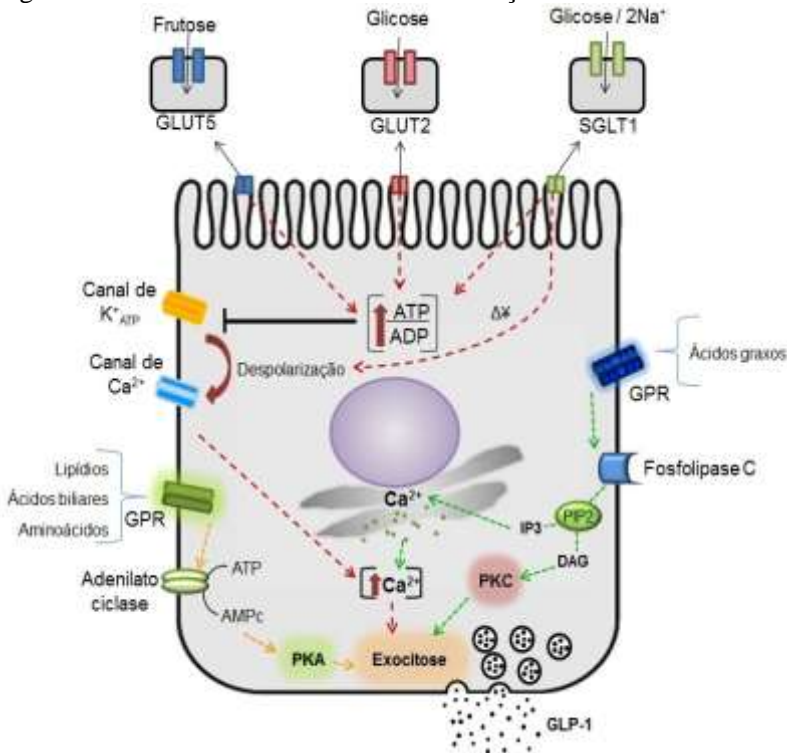
secreção de insulina no pâncreas. Alguns estudos mostram que os nutrientes e, dentre estes, principalmente a glicose, estimulam a secreção de GLP-1 (Fig. 6). A glicose é internalizada no enterócito através do transportador GLUT2. Seu metabolismo intracelular aumenta a relação de ATP/ADP, o que favorece o fechamento de canais de potássio dependentes de voltagem. O aumento de potássio intracelular favorece a despolarização. Alguns estudos mostram que a entrada de glicose também pode ocorrer via transportador SGLT1. Além disso, SGLT1 favorece o evento de despolarização por transportar juntamente com glicose, dois íons sódio. A despolarização permite a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e o influxo de cálcio favorece a ativação da maquinaria de exocitose de GLP-1 (Fig. 7) (LIM; BRUBAKER, 2006; TOLHURST; REIMANN; GRIBBLE, 2009).

Além da glicose, outros nutrientes como proteínas e lipídios também são capazes de estimular a secreção de GLP-1. No entanto, as vias para secreção diferem da estimulada por glicose. Os ácidos graxos de cadeia longa e curta parecem ativar vias de sinalização intracelulares que iniciam com sua interação com receptores acoplados a proteína G (GPR). A interação a GPR induz a ativação da fosfolipase C (PLC) e sequente conversão de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em inositol1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG), que promovem a mobilização de cálcio advindo dos estoques intracelulares. O cálcio advindo dos estoques, bem como, DAG, conduzem a ativação sequente da proteína cinase C (PKC). Ainda, outros mecanismos de ativação parecem envolver a ativação da via da proteína cinase A (PKA) dependente de AMPc. Intermediários do metabolismo lipídico também

podem ativar esta via (Fig. 7). (DIAKOIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012; BALK-MOLLER; HOLST; KUHRE, 2014).

A ativação da secreção de GLP-1 promovida por proteínas e aminoácidos é menos estudada. No entanto, se tem conhecimento de que a sinalização inicia com a interação a um subtipo de GPR, também promovendo o aumento intracelular de AMPc. Este mecanismo também parece estar envolvido no estímulo de secreção de GLP-1 mediado por ácidos biliares (DIAKOIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012).

Figura 7- Mecanismos intracelulares de secreção de GLP-1



A secreção de GLP-1 mediada por glicose envolve o fechamento de canais de K⁺ ATP e entrada de cálcio, via canal de cálcio dependente de voltagem. Este aumento de cálcio ativa a maquinaria de exocitose. Os lipídios e aminoácidos

aumentam os níveis de AMPc e ativam PKA e sequentemente a secreção de GLP-1. Os ácidos graxos de cadeia longa e curta ativam PLC e a conversão de PIP2 em IP3 e DAG, que aumentam cálcio intracelular e ativam PKC, sinais que promovem a secreção de GLP-1. Adaptado de: <http://www.diapedia.org/metabolism/incretin-secretion-direct-mechanisms>

1.2.3.3 Inativação de GLP-1

Após ser liberado na corrente sanguínea, o GLP-1 é rapidamente clivado pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-IV). Alguns estudos mostram que após ser liberado na corrente sanguínea, o GLP-1 apresenta uma meia vida de 1-2 min. A DPP-IV pode ser encontrada em vários tecidos, inclusive na circulação sanguínea, onde é encontrada como a forma solúvel da enzima, embora também seja expressa nas células endoteliais, inclusive de capilares que circundam órgãos endócrinos e do intestino (WAGET et al., 2011).

A DPP-IV é uma exopeptidase pertencente à família de proteínas S9B. Esta enzima age clivando dipeptídeos prolina ou alanina. A clivagem de GLP-1 resulta na forma GLP-1 (9-36). A perda dos peptídeos desta região N-terminal, resulta na inativação de GLP-1, pois são responsáveis pela interação de GLP-1 ao receptor (MATTEUCCI; GIAMPIETRO, 2009).

1.2.3.4 Secreção de insulina mediada por GLP-1 e efeitos em tecidos-alvo

As células β -pancreáticas expressam receptores para GLP-1. Nestas, o GLP-1 aumenta a responsividade da célula à glicose, pois aumenta a expressão de GLUT2 e da glicoquinase. Ainda, GLP-1

aumenta a expressão do gene da insulina, bem como a sobrevivência e massa das células β -pancreáticas por suprimir genes pró-apoptóticos e aumentar a expressão de genes anti-apoptóticos (DEACON, 2004).

Também, o GLP-1 possui um importante papel na secreção de insulina. A secreção de insulina mediada por este hormônio pode envolver vários mecanismos e ativação de proteínas intracelulares. No entanto, de uma forma geral, GLP-1 interage com o receptor (GLP-1R) na superfície das células β -pancreáticas. O receptor de GLP-1 pertence à família de receptores acoplados a proteína G. Portanto, a interação de GLP-1 ativa a adenilato ciclase promovendo um aumento intracelular de AMPc. O aumento de AMPc ativa PKA, resultando no aumento de cálcio intracelular e exocitose de vesículas contendo insulina (MELONI et al., 2013).

Entretanto, as ações do GLP-1 não se restringem às células β -pancreáticas. A expressão do receptor de GLP-1 é encontrada em diversos tecidos como sistema nervoso central e periférico, músculo, intestino, pulmões, rins, fígado, estômago e adipócitos. A interação de GLP-1 nestes órgãos é responsável por diversas atividades atribuídas ao GLP-1, como aumento da captação de glicose, inibição do apetite, diminuição do esvaziamento gástrico, bem como, controle corporal hídrico e térmico, pressão sanguínea e, inclusive, efeitos envolvendo melhora da memória e aprendizado (IMERYUZ et al., 1997; DEACON, 2004).

1.3 Manutenção da homeostasia da glicose

A homeostasia da glicose é estabelecida por meio de um equilíbrio entre a utilização da glicose pelos tecidos e a produção hepática de glicose. A insulina é o principal hormônio anabólico regulador deste equilíbrio, devido aos seus estímulos para a captação de glicose e inibição da produção hepática de glicose. No entanto, há também envolvimento de outros agentes neurais e hormonais, incluindo o glucagon, um hormônio catabólico contra-regulatório à insulina (BEARDSALL et al., 2006).

Durante o jejum, a baixa concentração de insulina sérica, permite que vias como a gliconeogênese e glicogenólise deixem de ser inibidas pela insulina e a síntese de glicogênio e a captação de glicose pelos tecidos seja suprimida pelo hormônio. Também no jejum, o glucagon liberado estimula estas vias de mobilização de glicose armazenada, permitindo a manutenção da glicemia dentro da normalidade (ARONOFF et al., 2004).

No período pós-alimentado, a elevação da glicose sanguínea permite a secreção de insulina, ativando as vias para captação de glicose pelos tecidos insulino-dependentes e síntese de glicogênio, enquanto suprime a secreção de glucagon. Este ciclo permite que os níveis de glicose sejam mantidos em diversas situações, como em períodos de baixa ou alta disponibilidade energética (ARONOFF et al., 2004).

A maquinaria envolvida na manutenção da homeostasia da glicose envolve a ação de mecanismos mediados por múltiplos componentes endógenos e exógenos como hormônios, aminoácidos, nutrientes, entre outros. Este amplo mecanismo de controle, permite que

os níveis glicêmicos sejam mantidos, em situações adversas, como em deficiências nutricionais, ou mesmo em situações de sobrecarga energética. No entanto, a cronicidade de um desequilíbrio entre oferta e demanda energética induz ao descontrole deste sistema, que inicia com a perda da capacidade de utilização e/ou captação de glicose pelos tecidos. Este desequilíbrio passa a se manifestar primariamente como um descontrole na glicemia, primeiro sintoma observado em um paciente intolerante à glicose ou diabético (HERMAN; KAHN, 2006).

Uma perda significativa da capacidade de controle deste sistema conduz ao surgimento dos primeiros sintomas da diabetes. De acordo com alguns estudos, no momento do diagnóstico de diabetes a perda da função das células β - pancreáticas já atingiu de 50% a 70%, com uma progressão anual que pode atingir 4% (NOVO NORDISK, 2014).

1.4 Diabetes

A diabetes é atualmente uma das doenças que mais afeta a população mundial. De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes, 8,3% da população adulta mundial vive com diabetes. Em números absolutos, em 2013 existiam 382 milhões de pessoas afetadas pela doença. Estimativas apontam que até 2035 a diabetes atingirá 592 milhões de pessoas, o que representa um aumento de 55%. Ainda, em 2013 ocorreram 5,1 milhões de mortes decorrentes da diabetes. Também, embora os dados se refiram a uma faixa etária de 29-79 anos, a maior parte dos atingidos tem entre 40 e 59 anos. Estes dados mostram claramente que a diabetes é uma epidemia mundial e um grave problema de saúde pública (IDF, 2013).

No Brasil, o número de pessoas portadoras da doença atingiu 11,9 milhões em 2013. A previsão é de que a doença atinja em 2035 19,2 milhões de pessoas. Estes dados classificam o país na quarta posição em número de diabéticos (IDF, 2013).

Este aumento progressivo da doença remete principalmente ao estilo de vida ao qual a população está condicionada atualmente. A ingestão de alimentos com alta carga energética altera o sistema homeostático que requer um equilíbrio entre oferta e demanda energética. Este desequilíbrio é percebido como uma perda da capacidade do organismo de utilizar e/ou liberar glicose dos estoques, conduzindo a um quadro de hiperglicemia persistente ou ao diagnóstico de diabetes (HERMAN; KAHN, 2006).

A diabetes é uma doença crônico-degenerativa ocasionada por uma disfunção no metabolismo dos carboidratos. Este distúrbio é caracterizado pela hiperglicemia, desencadeada por alterações na ação e/ou secreção de insulina, hormônio essencial para que a glicose plasmática seja internalizada em tecidos insulino-dependentes (GOMES, 2009).

Atualmente a diabetes é classificada em três subtipos principais, a diabetes tipo 1, diabetes tipo 2 e diabetes gestacional. A diabetes tipo 1, ocorre através da destruição das células β -pancreáticas secretoras de insulina, devido à ação de auto-anticorpos dirigidos contra este grupo celular. A mesma também pode ser decorrente de outros processos que não envolvam autoimunidade e por isso diferenciada como a forma idiopática da doença. A diabetes tipo 1 é o menos prevalente, sendo a forma majoritária (90 a 95% dos casos de diabetes diagnosticados) classificada como diabetes tipo 2 (GOMES, 2009).

A diabetes tipo 2 é o resultado da falha da célula β -pancreática em compensar adequadamente à reduzida sensibilidade periférica à insulina, aumentando a secreção do hormônio (WEIR et al., 2001; BROWLEE, 2001). Dessa forma, a hiperglicemia resultante está relacionada à diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos e a um aumento na produção hepática de glicose. Em indivíduos com função da célula beta normal, aumentos na demanda de insulina devido à resistência periférica ao hormônio são compensados por um aumento coordenado na secreção de insulina, mantendo assim os níveis de glicose plasmática dentro da normalidade. Em indivíduos geneticamente predispostos ao diabetes tipo 2, a falha da célula beta em compensar o aumento na demanda, resulta em progressiva elevação dos níveis de glicose e determina o início do quadro clínico da doença (DONATH; HALBAN, 2004). A diabetes gestacional se caracteriza por um quadro de hiperglicemia que perdura durante o período gestacional (GOMES, 2009).

Existem muitos mecanismos moleculares associados ao surgimento de intolerância à glicose, resistência à insulina e/ou alterações na secreção. Fatores inflamatórios e proteínas interferem na sinalização insulínica impedindo que a via de sinalização culmine com a secreção ou síntese de insulina. Estes efeitos podem ser mediados a partir de uma fosforilação que resulta na inativação de uma proteína essencial para a seqüência de sinalização da insulina. Ácidos graxos e outros lipídios em excesso também podem ativar vias de resistência à insulina. O aumento dos lipídios circulantes faz com que a capacidade de estoque no tecido adiposo seja saturada e o mesmo passe a ser

acumulado em tecidos como fígado e músculo (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Ainda, no diabético, existe a falha na secreção das incretinas, ou mesmo a perda da sensibilidade das células β -pancreáticas ao GLP-1, assim como outros tecidos. Também, o aumento da expressão de DPP-IV está associado com a supressão do efeito incretínico (HOLST; VILSBOLL, 2004; VILSBOLL; DEACON, 2009; HAN et al., 2010).

No entanto, a característica alarmante da diabetes são as complicações inerentes à doença. A hiperglicemia crônica neste pacientes desencadeia uma série de alterações que culminam com o surgimento das complicações micro e macrovasculares. Dentre estas alterações se destacam a retinopatia, neuropatia, nefropatia, doença arterial coronariana, coma e morte. A hiperglicemia persistente é o principal fator associado ao surgimento das complicações, principalmente devido a esta condição favorecer a glicação de proteínas e lipídios entre outros fatores, formando os chamados produtos finais de glicação avançada (AGES) (PEPPA; VLASSARA, 2005).

1.5 Complicações do diabetes e AGES

Os AGES são um grupo heterogêneo de moléculas formadas a partir de uma reação não-enzimática entre a porção aldeídica ou cetônica de açúcares redutores e resíduos amino de proteínas, lipídios ou ácidos nucléicos. Esta reação produz uma ligação covalente e conduz à formação da chamada base de schiff, um produto muito instável que rapidamente sofre um rearranjo formando o produto de Amadori, mais

estável e com um grupamento carbonila responsável pelas reações subsequentes à formação dos AGES. (BASTA et al., 2004).

A reação de formação de AGES prossegue com a formação de intermediários dicarbonílicos, a partir da degradação do produto de amadori. Alguns destes incluem o glioxal, metil-glioxal e a 3-deoxiglicosona formados através de reações de desidratação ou oxidação, por exemplo. Em um terceiro momento, estes produtos sofrem novas reações de desidratação, oxidação ou ciclização originando produtos altamente estáveis chamados de produtos finais de glicação avançada ou AGES. A principal via de formação de AGES associada ao diabetes é chamada de via dos polióis. A existência de altos níveis de glicose faz com que parte desta seja metabolizada a sorbitol, pela aldose redutase. Posteriormente, o sorbitol sofre ação de outras enzimas até formar intermediários como glioxal, metil-glioxal e 3-deoxiglicosona que a partir de um novo rearranjo, formam os AGEs. Além da síntese endógena de AGES, muitos podem ser ingeridos a partir de fontes exógenas. A dieta ocidental é conhecida por conter AGEs e portanto, ser uma fonte altamente deletéria ao organismo (SINGH et al., 2001).

Os AGEs são os produtos finais desta cascata de reações e se caracterizam por serem estruturas irreversíveis de coloração acastanhada e com capacidade de emitir fluorescência. A formação destes é considerada altamente deletéria ao organismo, em virtude de favorecerem a formação de espécies reativas de oxigênio, além de modificar a capacidade funcional de proteínas e enzimas em vários tecidos, entre estes, renal, endotelial, cardíaco, cerebral e epitelial (CALCUTT et al., 2009).

O mecanismo através do qual os AGES induzem as complicações nos diabéticos envolve a ligação a receptores específicos para os AGES, chamados de RAGES. Os RAGES podem ser expressos em vários tecidos e células como no epitélio vascular, células musculares lisas, monócitos e macrófagos. A ligação do AGE ao seu receptor ativa vias de sinalização intracelular que culminam com uma elevada expressão e síntese de fatores inflamatórios, além de geração de espécies reativas de oxigênio e tradução de proteínas não funcionais (AHMED, 2005).

As primeiras alterações observadas no diabético envolvem as microangiopatias. Estas se caracterizam por danos à retina, rins, nervos periféricos e a pele. Nestes locais, os capilares circundantes não possuem um bom controle da captação de glicose, estando por isso, condicionados aos efeitos deletérios da hiperglicemia e dos AGES (JAKUS; RIETBROCK, 2004; OTT et al., 2014).

No sistema renal, os AGES estão envolvidos com alterações em proteínas da matriz celular, com o sistema renina-angiotensina, induzem a liberação e síntese de citocinas, além de fatores que favorecem um ambiente oxidativo. A retinopatia diabética, também tem sua patogênese ligada a elevação da formação de AGES pois os mesmos alteram a elasticidade dos capilares que circundam a retina, além de promoverem o aumento de espécies reativas de oxigênio. A neuropatia é outra complicação comumente encontrada em pacientes diabéticos. A glicação de proteínas do citoesqueleto, envolvidas em funções estruturais essenciais das fibras nervosas, conduzem as alterações inerentes à neuropatia (AHMED, 2005).

Além das alterações microvasculares os AGES também estão associados a danos macrovasculares. A geração de espécies reativas de

oxigênio provocam alterações na elasticidade vascular, por diminuir a expressão e liberação do óxido nítrico, um importante vasodilatador, enquanto aumentam a liberação de endotelina, um potente vasoconstritor. Os AGEs também podem promover a glicação de lipoproteínas plasmáticas como a LDL, favorecendo seu depósito e formação de placas ateroscleróticas (AHMED, 2005; GOLDIN et al., 2006).

Os efeitos da progressão da diabetes são altamente prejudiciais e geralmente caracterizam a progressão letal da doença. Para tanto, este é atualmente, um dos principais focos de estudo para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

1.6 Tratamento da diabetes

Atualmente várias estratégias terapêuticas são utilizadas para o tratamento da diabetes. Entre estas, estão inclusas terapias não medicamentosas como o equilíbrio nutricional e a prática de exercícios físicos. No entanto, quando o controle glicêmico não é atingido por meio de alternativas não medicamentosas, a introdução de antidiabéticos se faz necessária (MERCK, 2014).

Dentre as classes de antidiabéticos orais podem ser encontrados os grupos de medicamentos que aumentam a secreção de insulina, os que suprimem a produção hepática de glicose, os que aumentam a captação periférica de glicose, os inibidores da absorção intestinal de glicose e mais recentemente os análogos do GLP-1 e os inibidores da reabsorção renal de glicose (SCHEEN; LEFEBVRE, 1998).

As sulfoniluréias pertencem à classe de agentes que estimulam a secreção de insulina. O mecanismo pelo qual estas agem está claramente descrito e envolve a inibição dos canais de K^+_{ATP} das células β -pancreáticas, promovendo a despolarização e sequente abertura de canais de cálcio e secreção de insulina. São representantes desta classe as sulfoniluréias de primeira geração, que incluem a tolbutamida, clorpropamida e tolazamida, e as de segunda geração como a glibenclamida, glipizida, glimepirida e gliburida. As últimas são mais potentes em relação às de primeira geração. As metilglinidas como a repaglinida e nateglinida também apresentam efeitos semelhantes às sulfoniluréias, no entanto, com um tempo de ação menor (FOWLER, 2007).

A metformina pertence ao grupo de fármacos que diminui a produção hepática de glicose, além de aumentar a sensibilidade dos tecidos periféricos à insulina. Entretanto, os mecanismos pelos quais a mesma atua, ainda não estão totalmente elucidados (FOWLER, 2007).

As glitazonas pertencem à família de antidiabéticos com ação sensibilizadora da insulina. Este efeito é observado no tecido adiposo, músculo esquelético e fígado. No tecido adiposo estas promovem também uma ação agonista de PPAR- γ , o que aumenta a expressão de genes que regulam a homeostasia da glicose e dos lipídeos, além de estimular a diferenciação celular. São representantes desta classe a rosiglitazona e pioglitazona (FOWLER, 2007; MERCK, 2014).

A acarbose pertence à classe de inibidores da absorção intestinal de glicose por inibir a enzima maltase e sacarase. Estas enzimas catalisam a reação de hidrólise dos dissacarídeos maltose e sacarose, respectivamente, liberando unidades de monossacarídeos, incluindo a

glicose, tornando-a disponível para absorção (FOWLER, 2007; RAZ, 2013).

Ainda, novas classes de medicamentos recentemente descobertas mostram efeitos promissores no controle glicêmico. Entre estas, estão os agonistas de GLP-1 como exenatide e liraglutida. Ambos promovem a secreção de insulina por mecanismos semelhantes ao GLP-1, porém, a principal vantagem em relação ao hormônio endógeno é a resistência à degradação pela enzima DPP-IV. Entretanto, outra classe da qual faz parte a sitagliptina e vidagliptina, aumentam a disponibilidade de GLP-1, por serem inibidores da enzima DPP-IV. Ainda, um novo alvo terapêutico, no qual a dapaglifozina age, é a inibição de SGLT2, um transportador que promove a reabsorção renal de glicose (INZUCCHI; MCGUIRE, 2008).

Na diabetes tipo 1 e eventualmente na diabetes tipo 2, é requerida a terapia insulínica. Os pacientes portadores da diabetes tipo 1 não apresentam produção endógena de insulina, o que requer a administração diária da mesma. Em diabéticos tipo 2 o tratamento insulínico pode ser requerido quando a doença progride também para a perda da capacidade do organismo de produzir ou liberar insulina (MERCK, 2014).

Existem vários análogos da insulina disponíveis no mercado. Os mesmos diferem principalmente em relação ao tempo e início de ação. A insulina de ação rápida promove efeitos após 15 min da administração com máxima efetividade após 30 min e duração de no máximo 4 h. A de curta duração perdura de 6 a 8 h e inicia os efeitos após 30 min com pico de atividade após 2 a 3 h. As insulinas de ação intermediária e longa

duração possuem efeito que pode perdurar de 16 a 24 horas (MERCK, 2014).

1.6.1 Plantas medicinais como fonte terapêutica

As plantas medicinais são uma importante fonte de compostos bioativos. Cerca de 30% dos fármacos comercializados tem origem na descoberta de compostos isolados de plantas (CALIXTO, 2000). Além dos antidiabéticos orais, muitas plantas são cientificamente catalogadas para o uso como antidiabéticos.

Atualmente, mais de 1000 espécies vegetais já foram descritas quanto as propriedades antidiabéticas, sendo estas ações associadas a inúmeros compostos presentes nas mesmas. O Brasil conta com uma imensa diversidade de espécies vegetais, o que permite a exploração e pesquisa nesta área. No entanto, poucas das muitas espécies catalogadas, foram estudadas quanto as atividades biológicas (MUKESH; NAMITA, 2013).

Dentre estas, algumas espécies do gênero *Polygala* de ocorrência Brasileira, não apresentam estudos de atividade anti-hiperglicêmica ou antidiabética, embora com outras espécies demonstrem potencial fonte terapêutica para o tratamento da doença.

Dentre as espécies estudadas estão: *P. rosmarinifolia*, *Polygala senega*, *P. erioptera* e *P. javana*. A *P. rosmarinifolia* reduz a glicemia de ratos diabéticos induzidos por alloxano. A *Polygala senega* e *P. erioptera* também foram eficientes na redução da glicemia em modelo de animal de diabetes tipo 2 e diabetes induzido por alloxano, respectivamente (KAKO *et al.*, 1996; SAMMAIAH & SRIVASTAVA,

2008; ALAGAMMAL et al., 2012a,b). A *P. javana* mostrou além de uma potencial redução na glicemia de ratos diabéticos, um aumento na secreção de insulina, sendo estes efeitos associados à presença de flavonoides, saponinas, fenóis e terpenos nos extratos analisados. (ALAGAMMAL et al., 2012a).

O gênero *Polygala* pertence à família Polygalaceae, formada por mais 12 gêneros. Aproximadamente 1300 espécies fazem parte desta família e são amplamente distribuídas, sendo o gênero *Polygala* o mais abundante. No Brasil são encontradas 110 espécies pertencentes a este gênero (LÜDTKE, 2008). Algumas espécies são conhecidas popularmente como “cânfora” devido à presença do salicilato de metila, sendo por isso, utilizados popularmente como anestésico, anti-inflamatório e em distúrbios intestinais, problemas renais e do sistema nervoso central. De fato, algumas destas atividades são cientificamente comprovadas. A espécie de *P. tenuifolia* apresenta estudos que comprovam sua ação protetora contra danos cerebrais e melhora da memória. A atividade anti-inflamatória também foi comprovada a partir de estudos com várias espécies como *P. japonica*, *P. tenuifolia* e *P. paniculata*, utilizando vários modelos experimentais (KLEIN; DE ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2012; ARRUDA-SILVA et al., 2014).

As atividades descritas estão associadas à presença de várias classes de compostos biologicamente ativos. Dentre estas, destacam-se as xantonas, grupo químico encontrado com maior frequência no gênero *Polygala* e por isso, classificado como marcador químico do gênero. As saponinas também são frequentemente encontradas no gênero *Polygala*. Além destas, cumarinas e flavonoides também já foram isolados de

algumas espécies, assim como, isoflavonas, embora o isolamento destas seja menos frequente (KLEIN; DE ANDRADE; CECHINEL FILHO, 2012).

A presença de isoflavonas e rutina em *P. molluginifolia* (Fig. 8) foi atribuída ao potencial efeito anti-inflamatório apresentado pela mesma. As isoflavonas e rutina foram isoladas como compostos majoritários no extrato (ARRUDA-SILVA et al., 2014). No entanto, não foram encontradas xantonas nesta espécie, apesar destes compostos serem considerados marcadores químicos do gênero. A *P. molluginifolia* é de ocorrência Brasileira e pode ser encontrada principalmente nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. (LÜDTKE, 2008).

A presença de isoflavonas nesta espécie desperta o interesse para o estudo de novos alvos terapêuticos, uma vez que, as isoflavonas são conhecidas por suas atividades biológicas.

Figura 8– *Polygala molluginifolia*



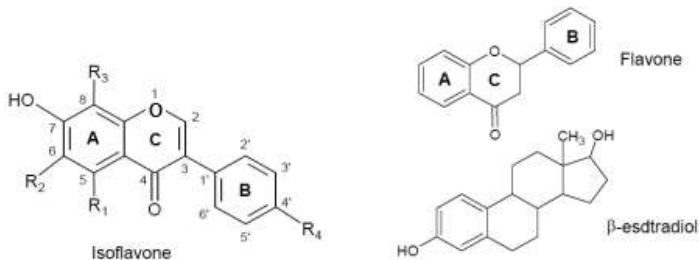
Fonte: Venzke et al., 2013.

1.7 Isoflavonas

As isoflavonas pertencem a uma subclasse de flavonoides diferindo estruturalmente das mesmas, devido a ligação do anel B ao carbono 3 do anel C, contrária à posição de ligação ao carbono 2 do anel central encontrado nos flavonoides (Fig. 9). As isoflavonas são encontradas principalmente na família das leguminosas, com uma distribuição bastante restrita entre outras espécies vegetais (DIXON, 2004; KO, 2014).

Dentre as principais e mais conhecidas fontes de isoflavonas está à soja, da qual, podem ser extraídas a genisteína e daidzeína. A genisteína é uma das isoflavonas mais estudadas quanto as propriedades terapêuticas. Um dos efeitos mais estudados é a atuação destas isoflavonas como fitoestrógenos, devido à semelhança estrutural com estrogênios endógenos, embora sem estrutura esteroidal (Fig. 9) (MORAN et al., 2013). Esta característica permite que muitas isoflavonas interajam com o receptor de estradiol (ER) promovendo ações que envolvem várias propriedades terapêuticas inerentes aos estrogênios. Por isso, são muito estudadas em mulheres no período pós-menopausa, quando os níveis de estrogênios endógenos tendem a decair. Efeitos no aumento da fertilidade também foram observados (DIXON, 2004).

Figura 9- Estruturas base das isoflavonas, flavonoides e estradiol



Fonte: (KO, 2014).

Além da atividade estrogênica, inúmeros outros efeitos benéficos são atribuídos as isoflavonas, associados ao efeito estrogênico ou não. Estes benefícios se estendem aos efeitos anti-câncer, principalmente de mama e próstata, além de demonstrarem um efeito protetor cardiovascular por reduzirem lipoproteínas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e inibirem sua oxidação, processo que inicia o quadro de aterosclerose. Também melhoram as funções cognitivas, além de fortalecer os sistema imune e anti-inflamatório (WANG et al., 2013).

Entretanto, uma das propriedades das isoflavonas que mais vem ganhando destaque é a antidiabética. A genisteína é uma isoflavona que apresenta muitos estudos em relação a esta atividade. Dentre estas, a genisteína tem demonstrado estimular a proliferação de células β-pancreáticas em modelos de diabetes tipo 2, além de suprimir a apoptose destas células e estimular a secreção de insulina. Estes efeitos estão associados à capacidade de interagir com os receptores de estradiol. Ainda, recentemente foi demonstrado que a genisteína se liga a um subtipo de receptor acoplado a proteína G (GPR30), através do qual, permite o aumento dos níveis intracelulares de AMPc e ativação de PKA, principal mecanismo promotor da atividade insulínica. Além

destes efeitos, a genisteína também parece promover a inibição das dissacaridases intestinais (FU; LIU, 2009; CHOI et al., 2010; GILBERT; LIU, 2013).

Estes efeitos apontam os inúmeros benefícios das isoflavonas, observados em diversos modelos animais, bem como, em estudos conduzidos com humanos, principalmente em mulheres em período pós-menopausa. Assim sendo, as isoflavonas despontam como interessantes alvos para tratamento alternativo e/ou complementar da diabetes.

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência de diabetes está aumentando em todo o mundo. As estimativas mostram que em 2035 a população que vive com diabetes tende a quase dobrar. Estes dados assinalam a necessidade de se adotar medidas preventivas e terapêuticas mais efetivas, a fim de evitar o aumento da prevalência, bem como, os elevados gastos públicos (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2014).

As formas terapêuticas atualmente adotadas no paciente diabético apresentam vários efeitos colaterais e não mimetizam eficientemente o controle glicêmico, não prevenindo, dessa forma, a evolução letal da doença (YI; PARK; MELTON, 2013). Para tanto, vários grupos de pesquisa buscam novas alternativas de tratamento antidiabético com o objetivo de melhorar o controle glicêmico e reestabelecer mecanismos envolvidos com a hiperglicemia, a fim de possibilitar a melhora da qualidade de vida do paciente diagnosticado com a doença. (HUNG et al., 2012).

Uma das fontes de maior foco para esta busca é o conhecimento popular aplicado ao uso de plantas medicinais com potencial efeito antidiabético. Encontram-se na literatura muitas plantas, cujos princípios ativos são eficientes no tratamento da diabetes. A linha de pesquisa de produtos naturais e diabetes do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais investe esforços (desde 1999), com o objetivo de detectar compostos com efetiva ação na homeostasia da glicose, bem como, elucidar os mecanismos celulares e moleculares de ação em modelos *in vivo* e *in vitro*.

Dentre estes trabalhos, várias plantas como a *Bauhinia forficata*, *Cyathia Phalerata*, *Vitex Megapotamica*, *Averrhoa Carambola*,

Wilbrandia ebracteata, *Baccharis articulata*, *Musa x paradisiada*, *Rosmarinus officinalis* L. entre outras, são detentoras de compostos com significativo efeito anti-hiperglicêmico, secretagogos de insulina e/ou insulino-miméticos (KAPPEL et al., 2012; ZANATTA et al., 2007; FOLADOR et al., 2010; SILVA et al., 2002; CAZAROLLI et al., 2006; CAZAROLLI et al., 2009).

Tendo como base o efeito anti-hiperglicêmico e/ou insulino-mimético já reportados por este grupo, o presente trabalho traz como expectativa a elucidação do mecanismo de ação de novos compostos com atividade antidiabética que possam, de fato, serem selecionados para o uso na terapia da diabetes. Dentre estas, o estudo com plantas do gênero *Polygala* é relevante, pois, algumas espécies demonstram efetividade no controle glicêmico, além de representarem uma alternativa terapêutica que poderá atuar de forma mais eficiente no controle da diabetes. Além disso, algumas espécies ainda não foram estudadas quanto aos seus efeitos biológicos, apesar de abrigarem compostos com potencial terapêutico. Dentre estas, se destaca a *Polygala molluginifolia*, espécie vegetal de ocorrência brasileira, porém ainda não estudada quanto aos efeitos antidiabéticos. Estudos conduzidos por Venzke et al. (2013), apontam a presença de isoflavonas na espécie de *P. molluginifolia*.

As isoflavonas tem se destacado pelo potencial efeito antidiabético, incluindo o aumento da proliferação das células produtoras de insulina e da secreção de insulina. A genisteína é uma das isoflavonas mais estudada em relação aos efeitos antidiabéticos. No entanto, escassos são os estudos que mostram a atividade de outras isoflavonas, com substituições e/ou diferenças estruturais como

potenciais alvos terapêuticos para a diabetes (FU; LIU, 2009; CHOI et al., 2010; GILBERT; LIU, 2013).

Diante do exposto, este estudo buscou caracterizar a ação antidiabética e/ou anti-hiperglicêmica das isoflavonas extraídas de *P. molluginifolia*, bem como, elucidar os mecanismos pelos quais estas ações ocorrem.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o efeito antidiabético da fração acetato de etila (PMFA) e das isoflavonas PMA19 e PMA2.31 extraídas de *Polygala molluginifolia* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar o efeito anti-hiperglicêmico e/ou hipoglicemiante (tolerância à glicose, secreção de incretina e de insulina) e o conteúdo de glicogênio muscular e hepático após tratamento agudo por via oral com a fração acetato de etila ou com as isoflavonas PMA2.31 e PMA19, em ratos euglicêmicos que receberam sobrecarga de glicose.
- Estudar o efeito *in vitro* da PMA2.31 na atividade de DPP-IV.
- Estudar o efeito e o mecanismo de ação da PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon de ratos euglicêmicos.
- Estudar o efeito da PMA19 e Estradiol na captação de ^{14}C -deoxi-D-glicose em ilhotas pancreáticas de ratos euglicêmicos.
- Estudar o efeito e o mecanismo de ação da PMA19 e do estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas de ratos euglicêmicos.
- Estudar o efeito da fração acetato de etila e da isoflavonas PMA2.31 e PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais (maltase, lactase e sacarase) em modelos *in vitro* e *in vivo*.

- Estudar o efeito da fração acetato de etila e da isoflavona PMA2.31 e PMA19 *in vitro* na glicação de proteínas séricas (glicose e frutose + albumina).
- Avaliar a toxicidade de PMA2.31 e PMA19 através da dosagem de LDH sérico.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

Albumina bovina sérica (BSA), cloreto de esteroilcarnitina (ST), N-[2-(p-bromocianamilamino) etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), nifedipina, tolbutamida, BAPTA-AM e diazoxide foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company® (St. Louis, MO, EUA). Glicose e outros solventes foram adquiridos da Vetec® (Florianópolis, SC, Brasil). Solvente para os procedimentos analíticos, etanol, e metanol foram adquiridos da Merk (Darmstadt, Alemanha). Todos os produtos químicos foram analiticamente graduados. O kit de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para determinação da insulina de rato (catálogo nº EZRMI-13K), GPL-1 ((GLP-1 (7-36) and GLP-1 (9-36 amide)) e de DPP (IV) (Cayman Chemical ®) foram adquiridos da Millipore (St. Charles, MO, Estados Unidos da América). [U-¹⁴C]-2-Deoxi-D-glicose (¹⁴C-DG), atividade específica 9.25 GBq/mmol, [⁴⁵Ca]CaCl₂ (sp. act. 321 KBq/mg Ca²⁺) e Optiphase Hisafe líquido de cintilação biodegradável foi adquirido da Perkin-Elmer Life e da Analytical Sciences (Boston, MA, EUA).

4.2 Obtenção de frações e compostos

O preparo das frações de *P. molluginifolia* e isolamento das isoflavonas PMA2.31 e PMA19 foram executados pela doutoranda Dalila Venzke, sob orientação do Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti do grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC (Venzke et al., 2013).

4.2.1 Preparação do extrato bruto

O material vegetal seco (partes aéreas) da espécie *Polygala molluginifolia* foi triturado e extraído com etanol etílico 96% a temperatura ambiente (três vezes e por um período de setes dias cada). Os extratos foram combinados, filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 50°C resultando no extrato bruto.

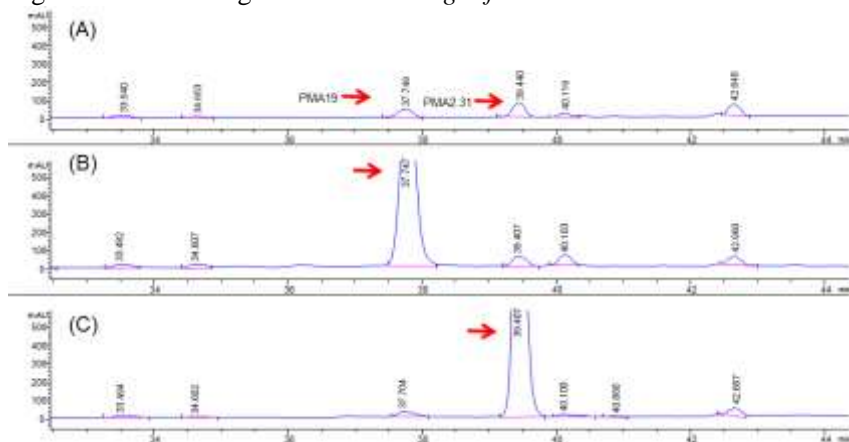
4.2.2 Extração líquido-líquido

O extrato bruto da espécie *Polygala molluginifolia* foi submetido à extração líquido-líquido utilizando como solventes o hexano e o acetato de etila. Os extratos foram lavados inicialmente com hexano até a extração exaustiva, o solvente foi removido sobre vácuo, obtendo-se então a fração hexano. Logo após, o restante do extrato bruto foi lavado com acetato de etila até a extração exaustiva obtendo-se a fração acetato de etila. O restante do extrato que não solubilizou nos solventes hexano e acetato de etila foi considerado como a fração aquosa.

4.2.3 Isolamento e purificação dos compostos

Os constituintes das frações acetato de etila da espécie *Polygala molluginifolia* foram separados por meio de cromatografia em coluna (CC) normal por adsorção em sílica (sílica gel 60), utilizando como eluente um gradiente crescente de acetato de etila em hexano, 1:9, 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 7:3, EtOAc e depois um gradiente crescente de EtOH em EtOAc 2:8, 4:6 respectivamente. As frações obtidas foram monitoradas

por cromatografia em camada delgada, utilizando como revelador o anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento. As frações 16 e 17 (acetato de etila 100%) foram reunidas e purificadas com metanol, gerando a isoflavona PMA2.31. As frações 12 e 13 foram reunidas da mesma forma, gerando a isoflavona PMA19. A Figura 10 apresenta o cromatograma do extrato bruto de *P. molluginifolia*. (A) representa a injeção do extrato bruto de *P. molluginifolia*; (B) representa a co-injeção do extrato bruto e PMA19, com aumento característico do pico; (C) representa a co-injeção do extrato bruto com PMA2.31, também com aumento do pico. PMA2.31 foi identificada como: 3',4'-dihidroxi-6'',6''',6''',6'''-tetrametilbis(pirano[2'',3'':5,6::2''',3''':7,8]isoflavona; e PMA19 foi identificada como: 5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6]isoflavona.

Figura 10 - Cromatograma de *P. molluginifolia*

4.3 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, Curitiba, PR, Brasil) e água e *ad libitum*. Animais em jejum foram privados de alimento por 16 h, sendo permitido acesso livre à água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo CEUA-UFSC PP00398 e PP00749).

4.4 Determinação da curva de tolerância oral à glicose, insulina e de GLP-1 sérico

4.4.1 Curva de tolerância oral à glicose

Neste estudo, foi utilizado um modelo animal de hiperglicemia amplamente utilizado com sucesso neste grupo de pesquisa (CAZAROLLI et al., 2009; FREDERICO et al., 2012). Os animais foram divididos em diferentes grupos de 5 animais. A hiperglicemia foi induzida por meio de dose única oral de glicose (4 g/kg; 8,9 M) em todos os grupos, exceto no grupo euglicêmicos, que recebeu apenas o veículo (etanol 1%). Portanto, os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo que recebeu apenas a glicose 4g/kg e veículo (Controle hiperglicêmico). O grupo euglicêmico recebeu apenas o veículo (etanol 1%). Os grupos tratados receberam glipizida (10 mg/kg), sitagliptina (10 mg/kg); fração acetato de etila (10, 25 ou 50 mg/kg) ou as isoflavonas PMA2.31 e PMA19 (0,1; 1 ou 10 mg/kg). Os tratamentos foram administrados 30 min antes da indução da hiperglicemia (sobrecarga de glicose). A glicemia foi medida antes do início do tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo, frações, glipizida, sitagliptina, isoflavonas PMA2.31 ou PMA19) e, após 30 min a sobrecarga de glicose foi administrada. Todos os tratamentos foram administrados por via intra-esofágica (gavagem). A curva de tolerância à glicose foi iniciada após a administração da glicose e a glicemia foi avaliada aos 15, 30, 60 e 180 min pelo método da glicose oxidase. Os resultados foram expressos em mg de glicose/dL no soro.

4.4.2 Determinação da insulina sérica

A detecção da insulina foi realizada através do ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante. O intervalo de valores detectados pelo presente ensaio foi de 0,51 ng/mL a 4,8 ng/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio para insulina foram 1,33 e 6,71, respectivamente, com uma sensibilidade de 0,1 ng/mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por meio de medições colorimétricas em 450 nm com um leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA), por interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng de insulina no soro mL⁻¹ (DAMAZIO et al., 2009).

4.4.3 Determinação do GLP-1 sérico

Para a medida do GLP-1, o sangue foi coletado nos tempos 0,15, 30 e 60 min após a sobrecarga de glicose. O sangue foi centrifugado e o soro obtido para a determinação da concentração de GLP-1 pelo método ELISA, seguindo as instruções do fabricante. A intervalo de valores detectados por este ensaio foi de 4,1-1000 pM. Os de coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio para o GLP-1 foram <5% e <12%, respectivamente, com um valor de sensibilidade de 1,5 pM. Os níveis de GLP-1 foram estimados por meio de medidas de absorbância a 450 e 590 nm. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como pM de GLP-1 no soro. (MOHAMED; SAWSAN; MOUSTAFA, 2013).

4.5 Determinação da atividade de DPP-IV *in vitro*

A atividade da DPP-IV foi determinada *in vitro* no grupo controle e no tratado com a isoflavona PMA2.31 (1, 10 e 100 nM e 10 e 100 µM) na presença ou ausência de sitagliptina (1, 10 e 100 nM). A atividade da DPP-IV foi determinada pela fluorescência de acordo com as recomendações do fabricante. Para a medida da Atividade enzimática a enzima DPP-IV foi incubada com tampão específico na ausência (atividade inicial 100%) e na presença dos tratamentos. A reação foi iniciada a partir da adição do Substrato AMC (H-Gly-Pro conjugada com aminometilcumarina). As amostras foram então incubadas durante 30 min a 37 °C e posteriormente a fluorescência foi determinada em aparelho TECAN (excitação 350-360 e emissão 450-465 nm) (KHALAF et al., 2013).

4.6 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em fatias do cólon intestinal

Para a obtenção de fatias do cólon, os animais foram mantidos em jejum de 16 h. Após eutanásia dos animais, uma porção do cólon foi removida, lavado em 0,9% de solução de NaCl e posteriormente transferido para placa contendo tampão KRb-HEPES pH 7,4. Posteriormente a porção do cólon foi seccionada em fatias com medida de 3 mm (PAPWORTH; PATRICK, 1970; WITKOWSKA et al., 1989).

As fatias foram incubadas (60 min) em incubador com agitação do tipo Dubnoff a 37 °C em KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 µCi/mL). Em alguns experimentos, agonistas/inibidores foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação. Foram

utilizados: glibenclamida (300 μM), diazoxide (250 μM), nifedipina (20 mM), ST (1 μM), BAPTA-AM (50 μM), E-forbol (100 nM) H-89 (10 μM). As fatias foram incubadas por 10 min em tampão KRb-HEPES sem (controle) ou com a isoflavona PMA2.31 (tratados). Após a incubação, uma solução contendo cloreto de lantânio (10 mM) a 2 °C foi adicionada às amostras para interromper o fluxo de cálcio. Este processo foi repetido por duas vezes. Após, as fatias foram homogeneizadas em 0,5 N de NaOH e fervidas por 10 min. Alíquotas 50 μL do tecido digerido foram adicionadas a um microtubo contendo 1 mL de líquido de cintilação (BATRA; SJÖGREN, 1983). A leitura da radioatividade foi realizada no cintilador (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Alíquotas de 5 μL da amostra foram utilizadas para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY, 1951).

4.7 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. O tampão Krebs Ringer (contendo 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 0.4 mM KH_2PO_4 , e 25 mM NaHCO_3 , carbogenado com O_2/CO_2 (95%:5%, v/v) até pH 7,4) adicionado de HEPES (8 mM), glicose 3 mM (KRb-HEPES) e colagenase (10 mg) foi injetado cuidadosamente no ducto pancreático até o pâncreas estar totalmente distendido. O pâncreas foi removido e mantido numa placa Petri com KRb-HEPES. Posteriormente o tecido foi transferido para tubo cônico (110 x 115

mm), centrifugado (centrifuga Excelsa Baby (modelo 206), FANEM, São Paulo, SP, Brazil), por 2 min. O sobrenadante foi descartado e foi realizada uma adição de 10 mL de KRb-HEPES livre de colagenase. Este processo foi repetido por 4 vezes, sendo o último realizado sem centrifugação. Alíquotas (100 μ L) de ilhotas isoladas foram transferidas para microtubos contendo 300 μ L de KRb-HEPES livre de colagenase. Após nova centrifugação o tampão foi removido e foi iniciado o ensaio com as ilhotas (CASTRO et al., 2014).

4.8 Captação de 14 C-glicose em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos

As ilhotas foram pré-incubadas durante 30 min e incubadas por 60 min num incubador com agitação do tipo Dubnoff a 37°C em KRb-HEPES (3 mM de glicose). 14 C-DG (0.1 μ Ci/mL) e tratamento (PMA19) foram adicionados a cada amostra durante a incubação. O tempo de tratamento foi 10 min. Após a incubação, as ilhotas foram homogeneizadas em 0,5 N de NaOH e fervidas por 10 min. 50 μ L de alíquotas do tecido foram adicionadas ao microtubo contendo 1 mL de líquido de cintilação. As amostras foram processadas como descrito por Jorge et al. (2004). A leitura da radioatividade foi realizada no cintilador (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA. 5 μ L de cada amostra foram utilizados para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951). A captação de glicose foi expressa como unidade de glicose/mg de proteínas.

4.9 Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos

As ilhotas foram incubadas (60 min) em um incubador com agitação do tipo Dubnoff a 37°C em KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose e $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (0,1 $\mu\text{Ci/mL}$). Em alguns experimentos, agonistas/inibidores foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação. Foram utilizados: tolbutamida (300 μM), diazoxide (250 μM), nifedipina (1 μM), ST (1 μM), H-89 (10 μM), KT (10 μM), Dantrolene (50 μM) (BATRA; SJÖGREN, 1983). As ilhotas foram incubadas por 10 min em tampão KRb-HEPES sem (controle) ou com PMA19 ou PMA2.31 (tratados). Uma solução contendo cloreto de lantânio (10 mM) a 2 °C foi adicionada às amostras para interromper o fluxo de cálcio. Os tubos foram centrifugados por 2 min a 8000 r.p.m. e o sobrenadante foi descartado e as ilhotas lavadas 3 vezes com o mesmo tampão. Após, as ilhotas foram homogeneizadas em 0,5 N de NaOH e fervidas por 10 min. Alíquotas 50 μL do tecido digerido foram adicionadas a um microtubo contendo 1 mL de líquido de cintilação. A leitura da radioatividade foi realizada no cintilador (modelo LS 6500; Multi-Purpose Scintillation Counter-Beckman Coulter, Boston, USA). Alíquotas de 10 μL da amostra foram utilizadas para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951).

4.10 Determinação do conteúdo de glicogênio

Para determinação do glicogênio muscular e hepático, músculo sóleo e o fígado foram removidos dos ratos hiperglicêmicos (controles) e de ratos submetidos aos respectivos tratamentos imediatamente após 3

h da sobrecarga de glicose. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH 33% sob fervura a 100 °C por 20 min. Após a fervura, foi adicionado etanol 96% e novamente, as amostras foram submetidas à fervura seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 r.p.m. durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (KRISMAN, 1962).

4.11 Determinação da atividade das dissacaridases intestinais *in vivo* e *in vitro*

Os ratos hiperglicêmicos tratados e não tratados *in vivo* foram utilizados para a determinação da atividade de dissacaridases intestinais, após 3 h da sobrecarga de glicose. Para os ensaios *in vitro* o tratamento foi realizado 5 min antes da incubação com substrato maltose, sacarose e lactose. O segmento do duodeno foi removido, lavado em 0,9% de solução de NaCl, secado sobre papel filtro, pesado, cortado, homogeneizado com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mL) e centrifugado (18000 r.p.m./8 min). O sobrenadante foi incubado a 37 °C durante 5 min com o substrato (maltose, sacarose e lactose) em tampão maleato (pH 6,0). Atividades da maltase, lactase e sacarase foram determinadas pelo método glicose oxidase de acordo com as recomendações do fabricante (PEREIRA et al., 2012). A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína (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 BSA como padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos, juntamente com os respectivos controles.

4.12 Determinação da atividade anti-glicação

Os AGEs foram formados num sistema *in vitro* (adaptado de KIHIO et al., 2004). A glicose (500 mM) ou a frutose (300 mM) foram incubadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4; azida sódica 0,02%) com BSA (10 mg/ml) na ausência (controle) ou na presença dos tratamentos (PMFA, PMA2.31 e PMA19). A fluorescência formada por AGEs foi medida com o Infinity M200 (TECAN) (excitação = 370 nm e emissão = 440 nm) antes do início da incubação (dia zero). Imediatamente após, a solução foi mantida em estufa com agitação e protegida da luz, a 37°C. A fluorescência foi medida no 7º, 14º e 28º dia (n = 5) (KIHIO et al., 2004).

4.13 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificadas nas legendas dos gráficos. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni através do programa INSTAT versão 2.2. a partir de 3 experimentos independentes. Também foi utilizado para avaliação de algumas

amostras o teste “*t*” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0,05$.

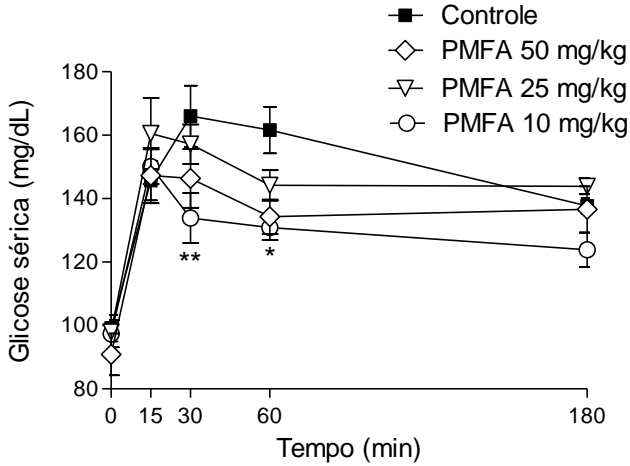
5. RESULTADOS

5.1 Resultados Parte 1 – Efeito anti-hiperglicêmico da fração acetato de etila (PMFA) de *Polygala molluginifolia*

5.1.1 Efeito da fração acetato de etila na curva de tolerância oral à glicose e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

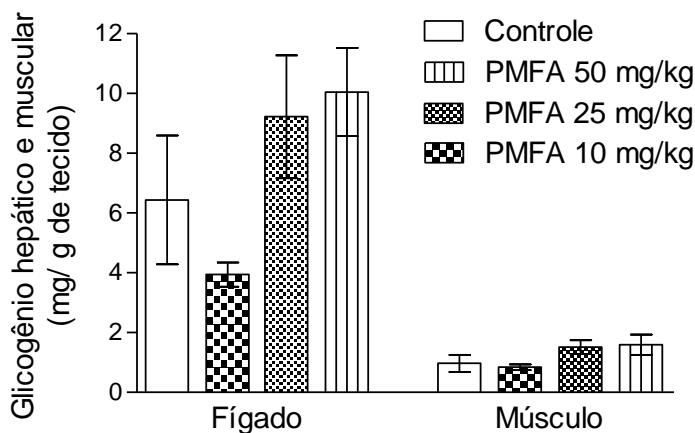
A Figura 11 apresenta a significativa redução na glicemia (em torno de 20%) obtida com o tratamento de 10 mg/kg da fração acetato de etila nos tempos 30 e 60 min, quando comparado com o controle. Ainda, para investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade anti-hiperglicêmica desta fração, foi determinado o conteúdo de glicogênio hepático e muscular e a atividade de dissacaridases intestinais. Como observado na Figura 12, não ocorreram alterações significativas no conteúdo de glicogênio hepático e muscular nas concentrações e tempos avaliados, quando comparado com o grupo controle.

Figura 11- Efeito agudo da fração acetato de etila na curva de tolerância a glicose



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ comparado ao grupo controle.

Figura 12 – Efeito agudo da fração acetato de etila no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

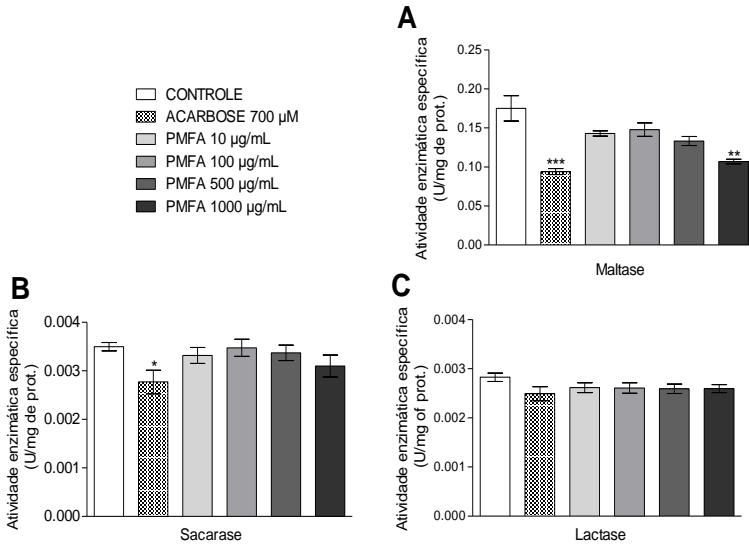


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento.

5.1.2 Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais

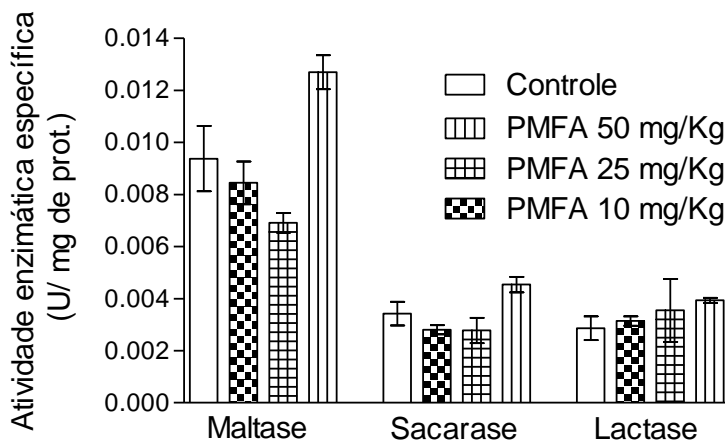
Os efeitos observados após incubação *in vitro* (Fig. 13) mostraram redução na atividade da maltase (A) quando comparado com o controle. Porém, nenhuma alteração foi observada na atividade da sacarase e lactase (Fig. 3 B, C). Contrariamente, não foi observado nenhum efeito após tratamento *in vivo* na atividade de maltase, sacarase e lactase, após 3 h (Fig. 14).

Figura 13 – Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais *in vitro*.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n = 5. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

Figura 14 – Efeito agudo da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 em duplicata para cada tratamento.

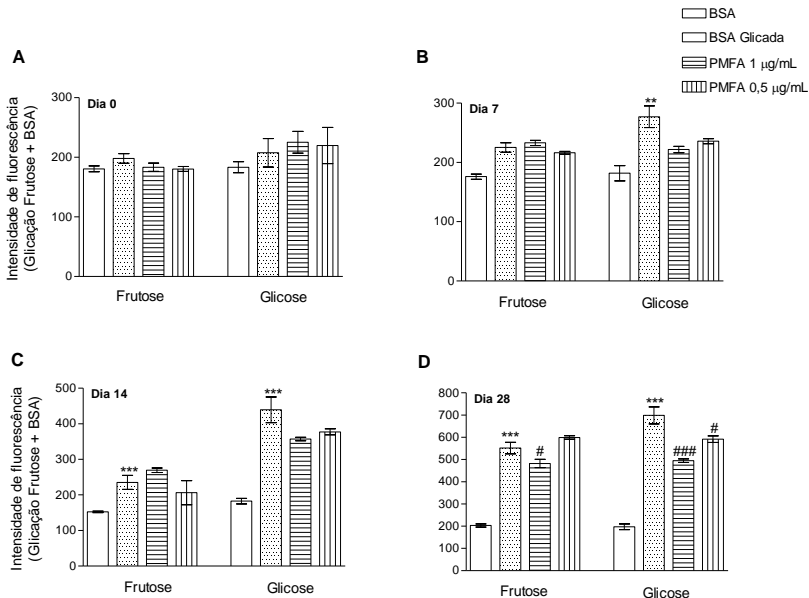
5.1.3 Efeito da fração acetato de etila na formação de AGES

Outra importante ação antidiabética, envolve a redução da formação de AGES, também investigada através de ensaio *in vitro* (Figura 15). No momento antecedente à incubação (dia 0), somente se observa a fluorescência intrínseca da albumina, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 15 A). A fração PMFA não apresentou fluorescência intrínseca.

Como esperado, após 7 dias de incubação da albumina com glicose, se observou o aumento significativo da formação de AGES, através do aumento da fluorescência (Fig. 15 B). Este efeito com a

frutose somente foi significativo após 14 dias (Fig. 15 C). Os resultados obtidos para o ensaio de glicação apontam que a fração acetato de etila reduziu significativamente a glicação na presença de glicose nas concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ após 28 dias de incubação. Quando incubada com frutose, apenas a dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a fluorescência e portanto, a formação de AGES (Fig. 15 D).

Figura 15- Efeito da fração acetato de etila na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

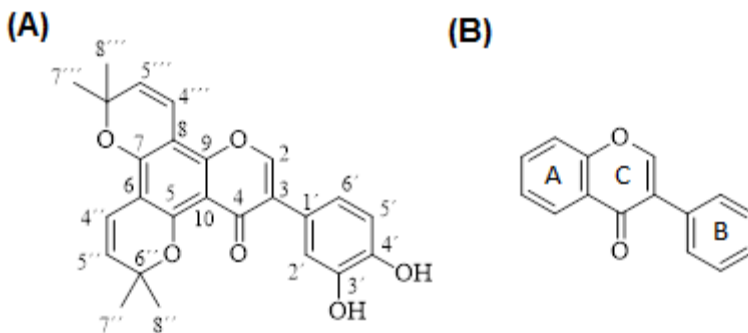


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 6$. *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

5.2 Parte 2 - Estudo do efeito da isoflavona PMA 2.31 na secreção de insulina, GLP-1 e na atividade da DPP-IV

A Figura 16 apresenta a estrutura de PMA2.31 $C_{25}H_{22}O_6$, isolada da fração acetato de etila de *Polygala molluginifolia*. Esta estrutura é inédita na literatura, sendo descrita pela primeira vez no trabalho de Venzke et al. (2013). A PMA2.31 apresenta dois anéis dimetilpirano ligados respectivamente aos carbonos 5, 6 e 7, 8 do anel A (Fig. 16 A), quando comparado com a estrutura base das isoflavonas (Fig. 16 B). Também, possui duas hidroxilas ligadas aos carbonos C3' e C4' do anel B. Revelada com anisaldeído, PMA2.31 apresenta uma coloração azulada característica. Isolada, se apresenta como um pó amarelado, com peso molecular de 418,44 g.

Figura 16 - Estrutura da isoflavona PMA2.31 (A) e estrutura base das isoflavonas (B)

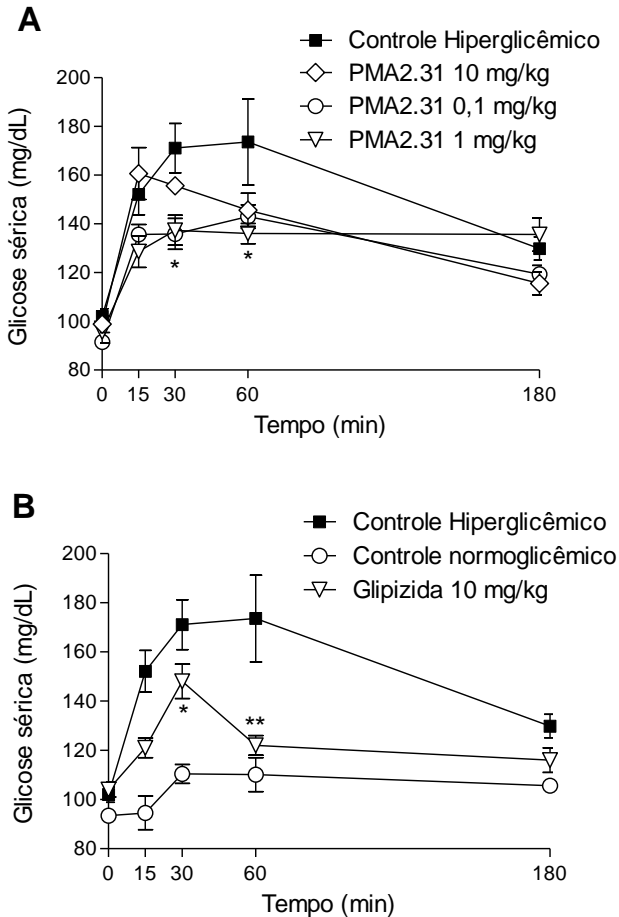


5.2.1 Efeito agudo de PMA2.31 na curva de tolerância oral à glicose

Como esperado, se observa um aumento da glicemia do grupo controle após a sobrecarga de glicose. Quando comparado com o grupo controle, (Fig 17 A), PMA2.31 apresentou redução significativa de 20% na glicemia com a dose 1 mg/kg. Este efeito foi observado após 30 min da sobrecarga de glicose e se manteve até os 60 min. Ainda, a dose de 0,1 mg/kg reduziu a glicemia nas mesmas proporções, no tempo 30 min, porém, este efeito não persistiu após este tempo. Contrariamente, a dose de 10 mg/kg não apresentou efeitos significativos na redução da glicemia, quando comparado com o controle.

A Figura 17 B apresenta os efeitos da glipizida na redução da glicemia, utilizada como controle positivo. Esta reduziu significativamente a glicemia nos tempos 30 e 60 min. Ainda, o controle normoglicêmico, que recebeu apenas o veículo (etanol 1%), não apresentou alterações no perfil glicêmico durante os tempos avaliados. Diante dos resultados, a concentração de 1 mg/kg de PMA2.31 foi escolhida para estudos subsequentes, por apresentar um efeito na redução da glicemia que se manteve dos 30 aos 60 min após sobrecarga de glicose.

Figura 17- Efeito agudo de PMA2.31 na curva de tolerância a glicose

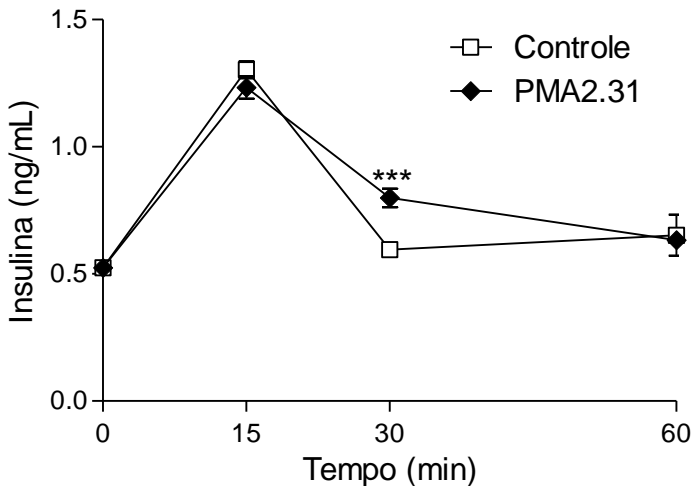


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n=5$ para cada tratamento. $*P \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ comparado ao grupo controle hiperglicêmico.

5.2.2 Efeito de PMA2.31 na secreção de insulina

A Figura 18 apresenta o efeito de PMA2.31 na concentração sérica de insulina. Como pode ser observado, PMA2.31 aumentou a insulina sérica quando comparado com o controle após 30 min da sobrecarga de glicose. No tempo 15 min e após 30 min, a secreção permaneceu igual ao controle.

Figura 18 - Efeito de PMA2.31 na secreção de insulina



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 3$ para cada tratamento.
 *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

5.2.3 Efeito de PMA2.31 e sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose

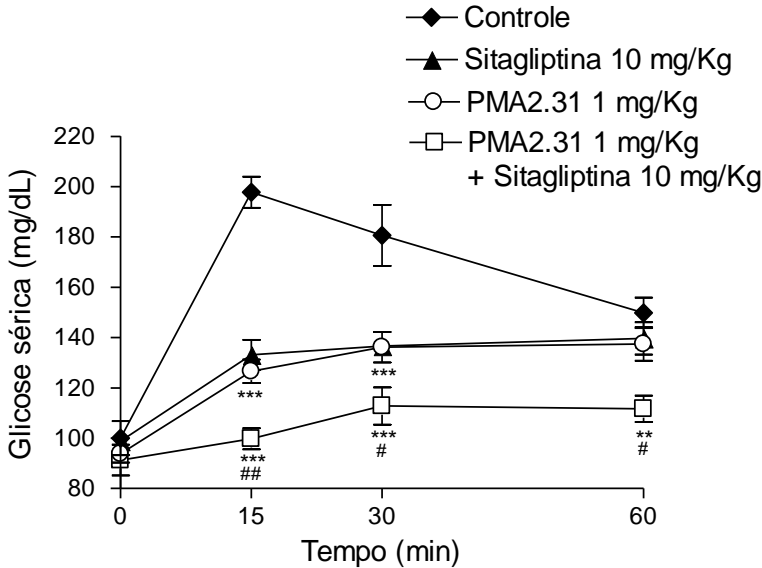
Com o objetivo de investigar o efeito da isoflavona PMA2.31 na ação das incretinas, uma nova curva de tolerância a glicose foi realizada.

Nesta, animais foram submetidos a tratamento com sitagliptina 10 mg/kg e PMA2.31 1 mg/kg, concentração que melhor respondeu ao teste de tolerância oral à glicose, supracitado.

Os resultados da Figura 19 apresentam a redução significativa da glicemia no tratamento com sitagliptina nos tempos 15 e 30 min. A isoflavona PMA2.31 reduziu a glicemia nas mesmas proporções da sitagliptina, sem diferenças significativas entre estes tratamentos. Comparado com o controle, estas reduções atingiram uma média de 33% em ambos os tempos. Curiosamente, quando os tratamentos foram combinados, se observou uma redução adicional da glicemia quando comparado com o grupo somente tratado com PMA2.31. Esta atividade se manteve do tempo 15 aos 60 min, com redução média de 12% comparada a PMA2.31 e sitagliptina tratados separadamente.

Estes resultados mostram um efeito somado quando PMA2.31 e sitagliptina são tratados concomitantemente. A sitagliptina age inibindo DPP-IV, enzima que degrada GLP-1. Dessa forma, os estudos subsequentes foram embasados na hipótese de que a PMA2.31 pode agir também inibindo a DPP-IV e/ou estimulando a secreção de GLP-1.

Figura 19 – Efeito Agudo de PMA2.31 e sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 5$ para cada tratamento. ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$; ### $p < 0,01$ comparado com o grupo PMA2.31 1 mg/Kg.

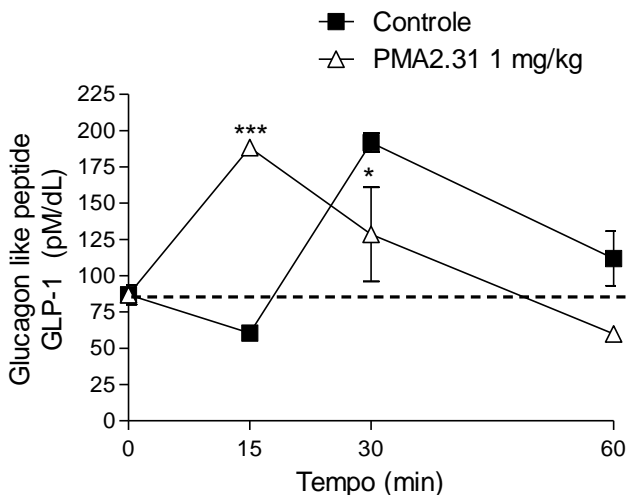
5.2.4 Efeito de PMA2.31 na secreção de GLP-1

O GLP-1 é um importante hormônio secretado pelas células L do intestino, que atua no pâncreas contribuindo com a secreção de insulina pós-prandial. Diante do efeito observado para PMA2.31 quando administrado com sitagliptina, o objetivo seguinte foi avaliar os níveis de GLP-1 após tratamento com PMA2.31 (1 mg/kg).

Pode ser observado na Figura 20 que PMA2.31 elevou significativamente os níveis séricos de GLP-1 no tempo de 15 min,

quando comparado com o controle. Este efeito não persistiu durante o tempo 30 e 60 min.

Figura 20 – Concentração sérica de GLP-1



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

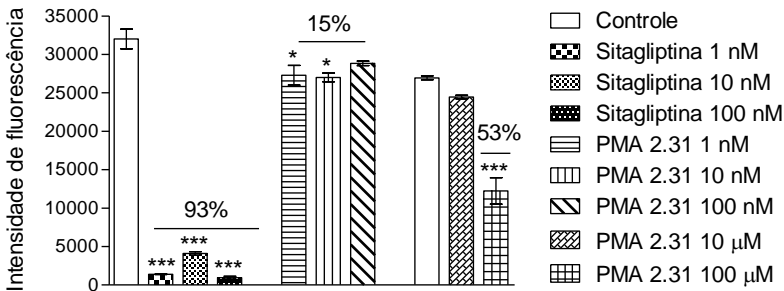
5.2.5 Efeito de PMA2.31 na atividade de DPP-IV

A fim de determinar se o aumento de GLP-1 observado na Figura 20 pode ser decorrente da inibição da atividade de DPP-IV, foi realizado um experimento *in vitro*, com DPP-IV.

Os resultados (Fig. 21) revelam que PMA2.31 reduziu significativamente a atividade de DPP-IV na concentração de 1 e 10 nM quando comparado com o controle. Em termos percentuais, houve um declínio de 15% na atividade de DPP-IV. Contudo, a concentração de 100 nM não alterou a atividade da enzima. Também não houve

alteração na atividade de DPP-IV na concentração de 10 μM . Porém, quando avaliada a concentração de 100 μM de PMA2.31, houve uma redução de 53% da atividade de DPP-IV. Estes dados apontam que PMA2.31 pode inibir significativamente a atividade de DPP-IV. Este efeito representa 43% da atividade observada para a sitagliptina, que inibiu em média 93%, com 1, 10 e 100 nM.

Figura 21 – Efeito de PMA2.31 na atividade de DPP-IV



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n=3$ para cada tratamento. * $P \leq 0,05$ *** $p \leq 0,001$, comparado ao grupo controle.

5.2.6. Estudo do mecanismo de ação da isoflavona PMA2.31 na secreção de GLP-1 no intestino

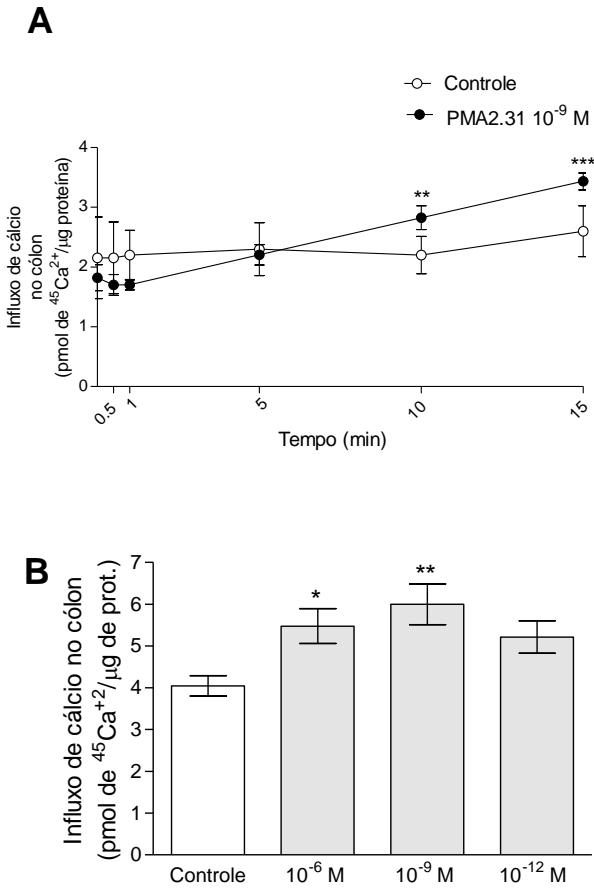
O GLP-1 é secretado pelas células L intestinais situadas predominantemente no cólon. Nestas células, o aumento do cálcio intracelular é etapa fundamental para a exocitose de vesículas contendo GLP-1 (DIAKOIANNAKI; GRIBBLE; REIMANN, 2012). Com base nestes dados, o efeito de PMA2.31 no influxo de cálcio no cólon foi estudado.

5.2.6.1 Curva curva de tempo e curva dose-resposta de PMA2.31 no influxo cálcio no cólon

Os resultados apresentados na Figura 22 A demonstram que, em 10 min de incubação ocorre o estímulo do influxo de cálcio persistindo após 15 min, sem diferenças entre os dois tempos. Com base nestes resultados, os estudos subsequentes foram desenvolvidos no tempo de 10 min.

Na presença de PMA2.31 (Fig. 22 B), se observou um efeito dependente da dose, com aumento respectivo de 38 e 50% do influxo de cálcio nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-9} M quando comparada com o controle. No entanto, na concentração de 10^{-12} M não houve efeito significativo em relação ao controle. A concentração de PMA2.31 10^{-9} M foi então utilizada para investigar os mecanismos intracelulares envolvidos no aumento do influxo de cálcio no cólon.

Figura 22– Curva de tempo de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ e curva de dose-resposta de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon

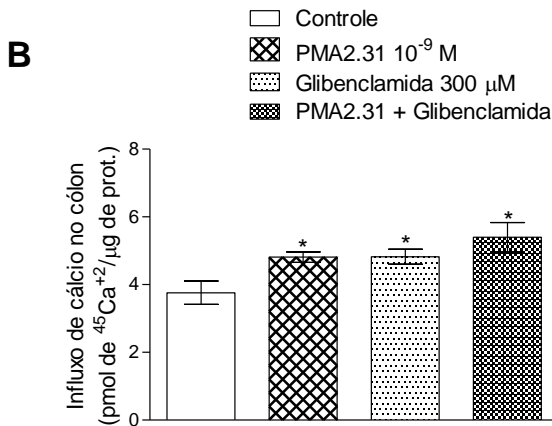
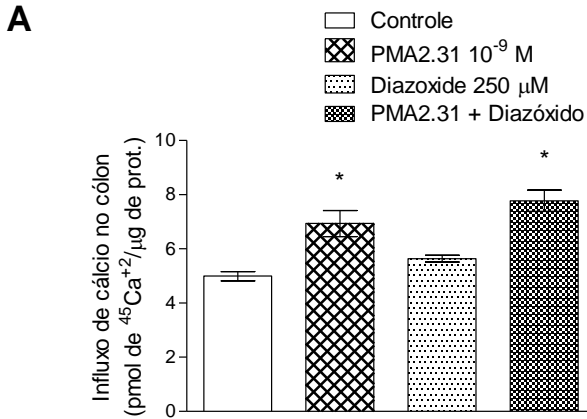


Curva de tempo de influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (A) e curva dose-resposta de PMA2.31 (B). Pré-incubação= 60 min; Incubação= 10 min. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 6. * $P \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle.

5.2.6.2 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon

A Figura 23 mostra o efeito estimulatório do PMA2.31 no influxo de cálcio e o envolvimento dos canais de K^+_{ATP} . Estes canais estão envolvidos no mecanismo de secreção de GLP-1. O diazoxide (Fig. 23 A), que promove a abertura dos canais de K^+_{ATP} , não alterou o influxo de cálcio em relação ao controle. Ainda, quando os dois compostos foram co-incubados (PMA2.31 + diazoxide), a isoflavona manteve o efeito estimulatório no influxo de cálcio. Também, na presença de glibenclamida (Fig. 23 B), que atua fechando o K^+_{ATP} , pode ser observado o efeito clássico de aumento do influxo de cálcio. Porém, quando combinada a glibenclamida e PMA2.31, o influxo de cálcio permaneceu similar ao efeito dos compostos utilizados isoladamente.

Figura 23 – Envolvimento de canais de K^+ no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ no cólon

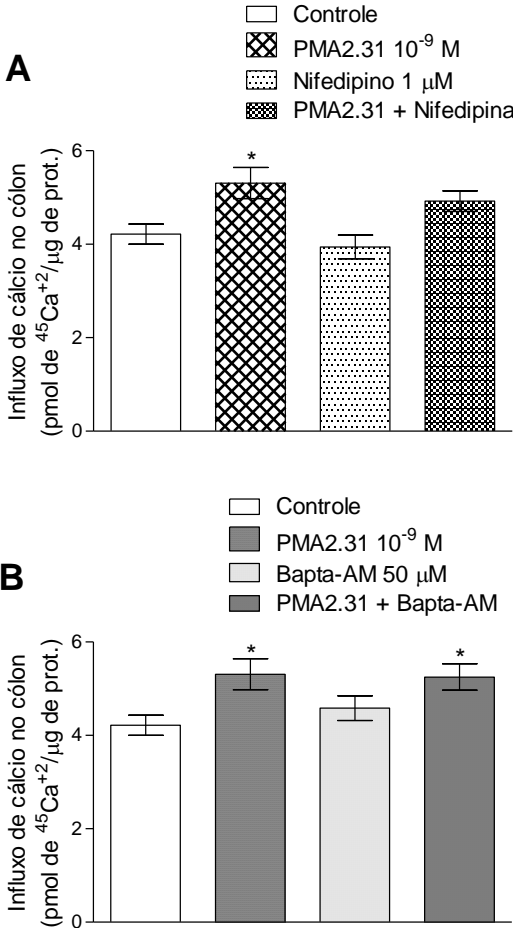


Glibenclamida (300 μ M) (A) e diazoxide (250 μ M) (B) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Média \pm E.P.M.; n=6. * $P \leq 0.05$ comparado ao grupo controle.

5.2.6.3 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e cálcio interno no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon

Os canais de cálcio também participam do mecanismo de secreção de GLP-1. A presença de nifedipina (Fig. 24 A), inibidor dos canais de cálcio dependentes de voltagem, não afetou o efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de cálcio, assim como a presença do quelante de cálcio intracelular, BAPTA-AM (Fig. 24 B). Nas concentrações utilizadas, nifedipina e BAPTA-AM não alteraram o influxo basal de cálcio.

Figura 24 - Envolvimento dos VDCC-L e do Ca^{2+} intracelular no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon.

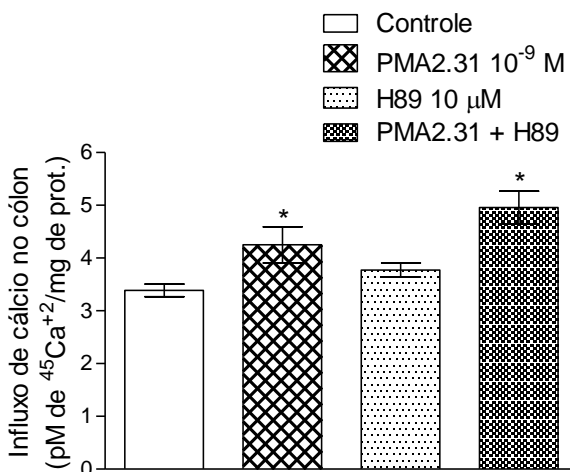


Nifedipina ($1 \mu\text{M}$) (A) e BAPTA-AM ($50 \mu\text{M}$) (B) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Média \pm E.P.M.; n=6. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.2.6.4 Envolvimento de PKA no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon

A secreção de GLP-1 também envolve mecanismo de ativação de mensageiros intracelulares como a proteína cinase A (PKA) e/ou a proteína cinase C (PKC). Dessa forma, foi avaliado o efeito de PMA2.31 na presença do H89, inibidor de PKA (Fig. 25). Os resultados mostram que não houve alterações no perfil de influxo de cálcio quando combinados H89 e PMA2.31.

Figura 25 - Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon



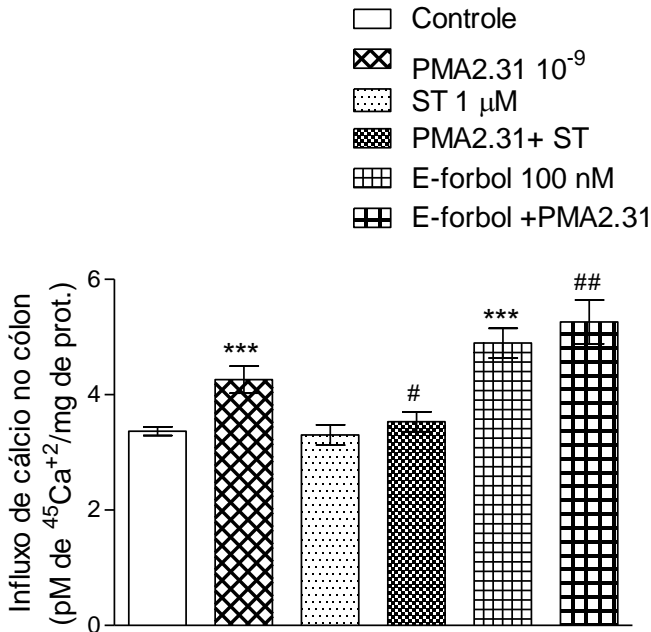
H-89 ($10\ \mu\text{M}$) presente durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Média \pm E.P.M.; n=6 * $P \leq 0,05$.

5.2.6.4 Envolvimento da PKC no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon

A incubação com a estearoil carnitina (ST), inibidor de PKC, não alterou o influxo basal de cálcio. Porém, quando incubado com

PMA2.31, o efeito estimulatório da isoflavona foi suprimido (Fig. 26) . Estes resultados corroboram com os obtidos quando PMA2.31 foi incubado com o éster de forbol (E-forbol), um ativador de PKC. Observou-se um efeito adicional no influxo de cálcio quando incubados juntamente. E-forbol também aumentou significativamente o influxo de cálcio quando comparado com o controle.

Figura 26 - Envolvimento da PKC no efeito estimulatório de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ no cólon

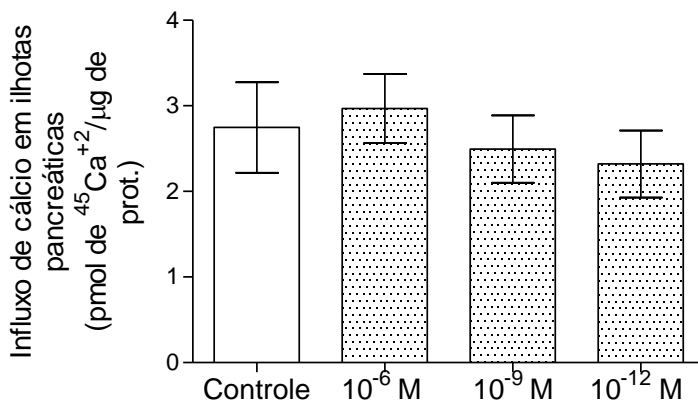


ST ($1 \mu\text{M}$) e E-forbol (100 nM) presente durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Média \pm E.P.M.; n=6. *** $P \leq 0,001$ comparado com grupo controle; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,01$ comparado com grupo PMA2.31.

5.2.6.5 Envolvimento de PMA2.31 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas

O aumento de cálcio intracelular também está intimamente associado a excitose de vesículas de insulina nas células β -pancreáticas. Com o objetivo de avaliar se PMA2.31 pode estimular de forma independente a secreção de insulina, sem intermédio de GLP-1, foi avaliado o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas. Conforme apresentado na Figura 27, PMA2.31 não alterou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas.

Figura 27 - Efeito de PMA2.31 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

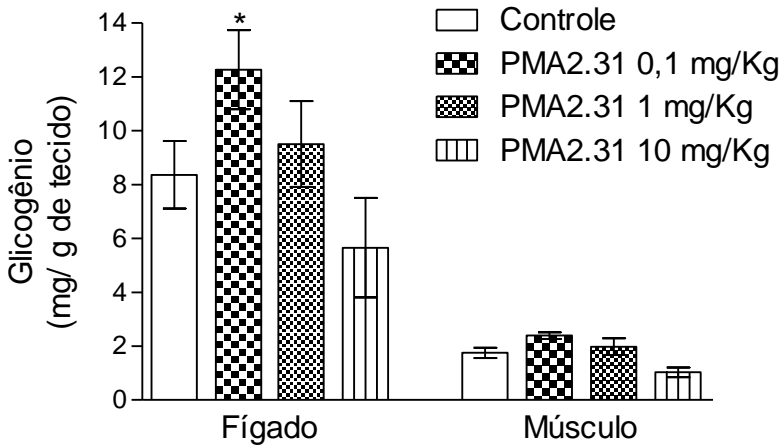


Pré-incubação= 60 min; Incubação= 0 a 15 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6.

5.2.7 Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

Pode ser observado na Figura 28 que PMA2.31 aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio hepático, após 3,5 h de tratamento, na concentração de 1 mg/kg. As concentrações de 0,1 e 10 mg/kg não produziram efeitos significativos no conteúdo de glicogênio hepático, assim como para o glicogênio muscular em todas as concentrações avaliadas.

Figura 28 - Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

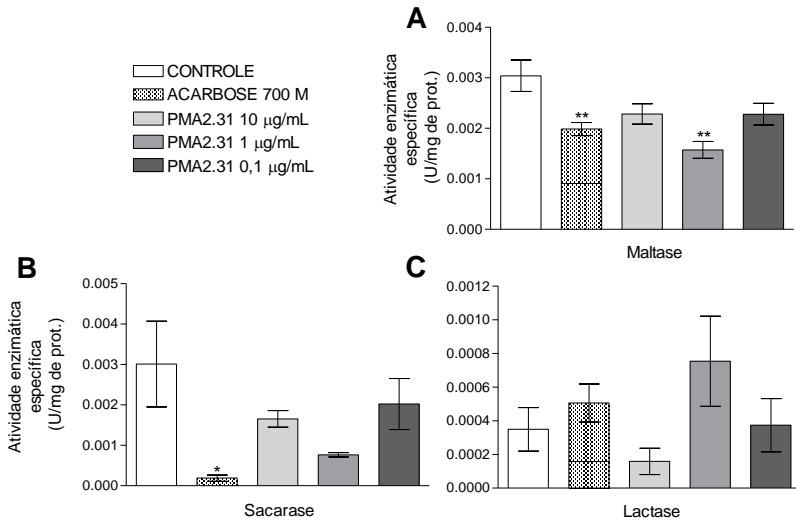


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.2.8 Efeito de PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo* e *in vitro*

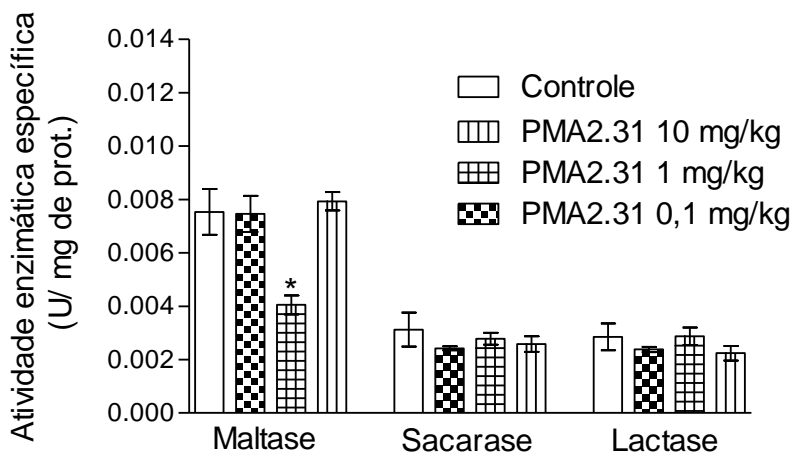
A isoflavona PMA2.31 reduziu significativamente a atividade de maltase em modelo experimental *in vitro* (Figura 29 A) na concentração de 1 µg/mL. Estatisticamente, essa redução foi semelhante à acarbose, representando em valores percentuais 47 e 38%, respectivamente. Diferentemente da acarbose, PMA2.31 não afetou a atividade de sacarase (Fig. 29 B). Também não foram observadas alterações na atividade de lactase (Fig. 29 C). O efeito inibitório de PMA2.31 na atividade de maltase foi reproduzido também *in vivo* (Fig. 30). Na concentração de 1 mg/kg, PMA2.31 reduziu significativamente (45%) a atividade de maltase quando comparado com o controle. Contrariamente, as demais doses avaliadas não alteraram a atividade das dissacaridases.

Figura 29 - Efeito PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais *in vitro*



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

Figura 30 - Efeito de PMA2.31 na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*

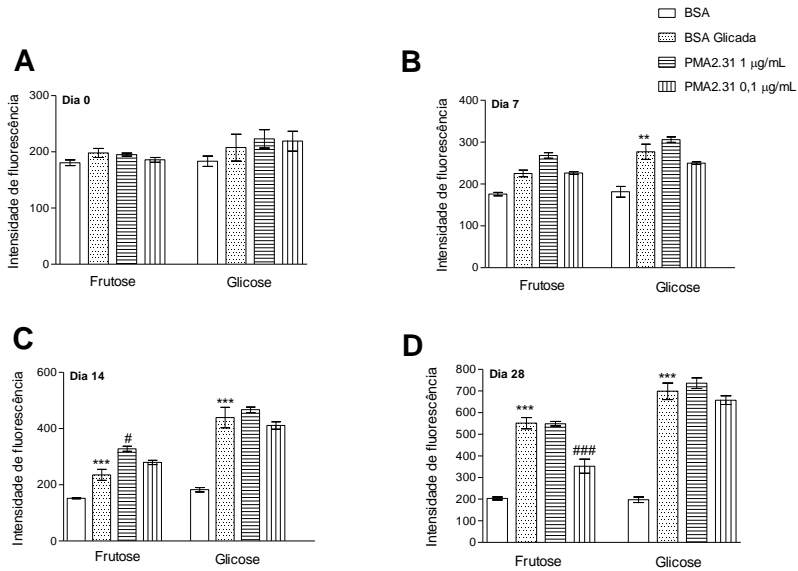


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n=5$ para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.2.9 Efeito inibitório de PMA2.31 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose

Como pode ser observado na Figura 31, no dia 0 não há diferenças entre os grupos (Figura 31 A), comparado ao grupo BSA. Porém, após 7 dias de incubação, se observa um aumento significativo da fluorescência com glicose, sem alterações para os demais grupos (Figura 31 B). Após 14 dias, ocorreu aumento tanto de glicose quanto de frutose. Ainda, com 14 dias de incubação PMA2.31 1 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a glicação com frutose. Este efeito foi suprimido após 28 dias nesta dose e foi significativamente menor na dose de 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 31 - Efeito de PMA2.31 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

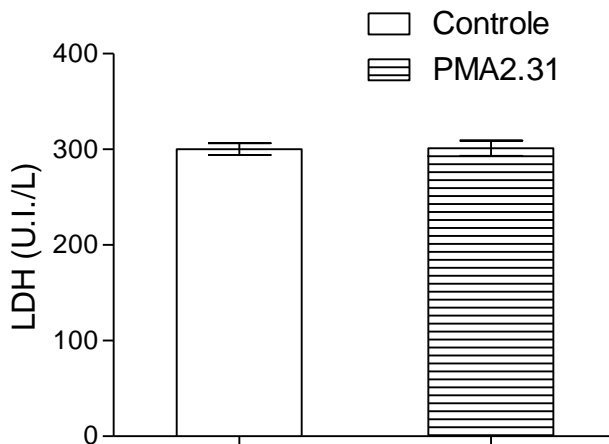


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n = 5$. *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

5.2.10 Efeito de PMA2.31 na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH)

A medida do LDH sérico foi utilizada como indicador de toxicidade do composto. Como observado na Figura 32, PMA2.31 não alterou a atividade de LDH após 3 h de tratamento.

Figura 32 - Efeito de PMA2.31 na concentração de LDH

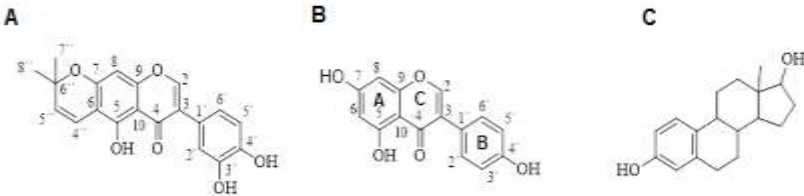


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5.

5.3 Parte 3 – Papel da isoflavona PMA19 na secreção de insulina

A Figura 33 apresenta as estruturas das isoflavonas PMA19, genisteína e estradiol. A genisteína (Fig. 33 B) não apresenta um núcleo esteroidal como o estradiol (Fig. 33 C), porém é capaz de interagir com os receptores de estradiol. De maneira semelhante, PMA19 $C_{20}H_{16}O_6$ (Fig. 33 A) também é uma isoflavona que difere da genisteína pela presença de uma hidroxila no carbono C-3' do anel B, além de conter um anel dimetilpirano conectado aos carbonos C-6 e C-7 do anel A, enquanto que na genisteína há a presença de um grupo hidroxila no C-7 do anel A. PMA19 se apresenta como um pó de coloração amarelada com peso molecular de 352,34 g.

Figura 33 – Estrutura química das isoflavonas PMA19 (A), Genisteína (B), e estradiol (C)

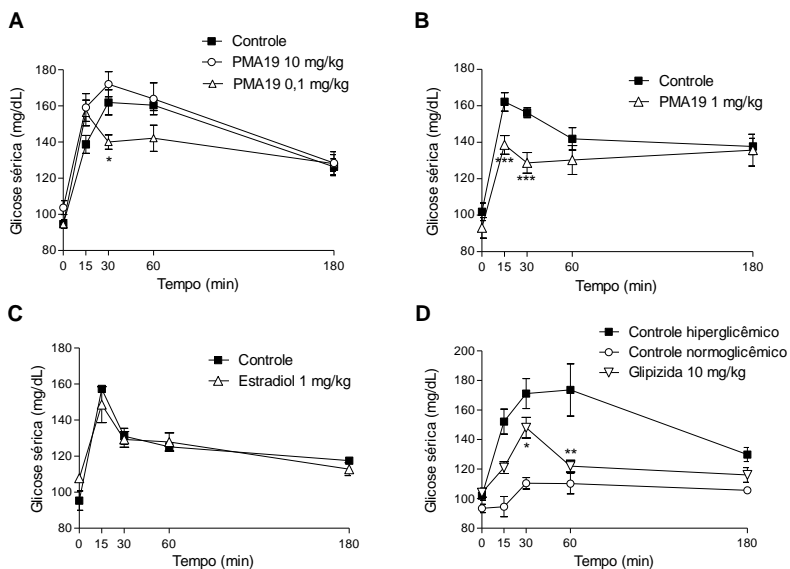


5.3.1 Efeito agudo de PMA19 e estradiol na curva de tolerância oral à glicose

A Figura 34 apresenta à curva de tolerância oral a glicose, com PMA19 e Estradiol. Como pode ser observado na Figura 34 A, PMA19, na concentração de 0,1 mg/kg reduziu em média 14% da glicemia após 30 min da sobrecarga de glicose. No entanto, quando 10 mg/kg de PMA19 foram utilizados este efeito não foi observado. Entretanto, a maior eficiência na redução da glicemia foi observada com a dose de 1 mg/kg, que reduziu a glicemia em 17% e manteve este efeito até 30 min da sobrecarga de glicose (Fig. 34 B). Devido a maior eficiência e manutenção do efeito, a dose de 1 mg/kg de PMA19 foi utilizada nos estudos subsequentes.

O estradiol não reduziu a glicemia na dose avaliada (Fig. 34 C). A glipizida exerceu seu efeito redutor da glicemia nos tempos 30 e 60 min, enquanto que o controle normoglicêmico manteve os níveis normais, sem alterações entre os tempos (Fig. 34 D).

Figura 34 - Efeito agudo de PMA19 na curva de tolerância a glicose

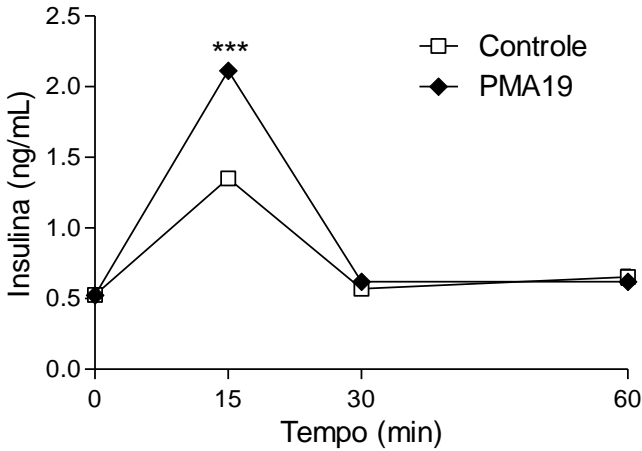


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

5.3.2 Efeito de PMA19 na secreção de insulina

A Figura 35 mostra que PMA19 aumentou significativamente os níveis de insulina após 15 min da sobrecarga de glicose quando comparado com o controle. Após este tempo não houve diferenças significativas.

Figura 35 - Efeito de PMA19 na secreção de insulina



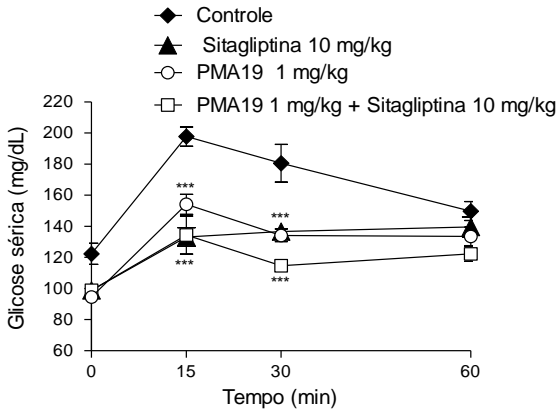
Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n=3$.*** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

5.3.3 Efeito de PMA19 combinado com sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose

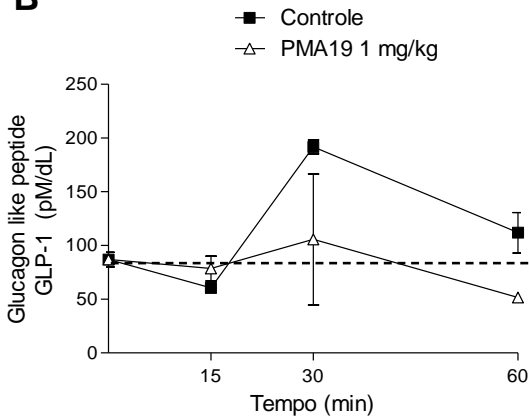
O estudo de PMA19 e sitagliptina revelou que quando combinados estes tratamentos, ocorre uma significativa redução na glicemia, porém, este efeito não é diferente do observado para os tratamentos com os compostos individuais (Fig. 36 A). Ainda, PMA19 não alterou a concentração sérica de GLP-1 (Fig. 36 B).

Figura 36 – Efeito Agudo de PMA19 e Sitagliptina na curva de tolerância oral à glicose

A



B



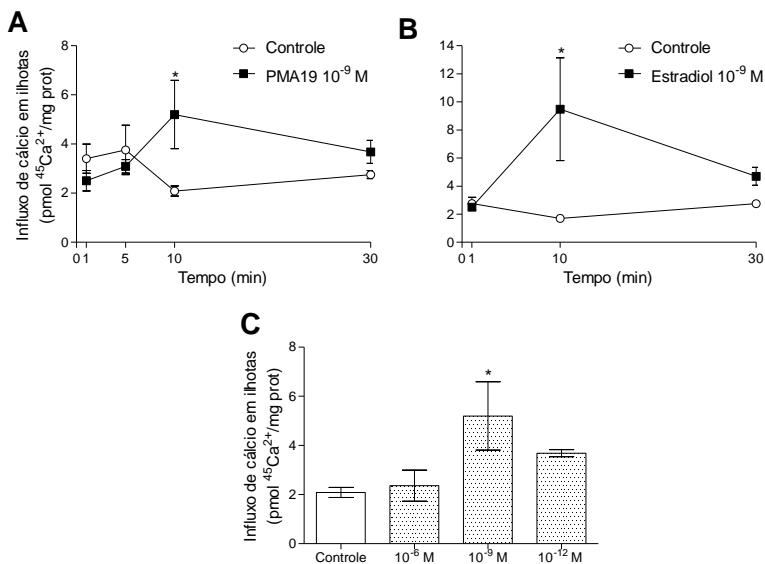
Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento.
 *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

5.3.4 Efeito de PMA19 na curva de dose-resposta e de tempo em ilhotas pancreáticas

Neste estudo, o aumento do influxo de cálcio nas ilhotas, é interpretado como um sinal para a secreção de insulina. Após uma incubação de 60 min, necessária para a manutenção do equilíbrio do cálcio entre os diferentes compartimentos celulares e o meio extracelular, as ilhotas foram incubadas na presença ou ausência de PMA19 e estradiol.

Na presença de PMA19 10^{-9} M, houve aumento significativo (160%) do influxo de cálcio após 10 min de incubação (Fig. 37 A). Esta atividade se manteve somente neste tempo, sem diferenças após 30 min. O mesmo efeito foi observado para o estradiol, que aumentou significativamente (224%) o influxo de cálcio após 10 min (Fig. 37 B), sem efeitos após 30 min. Os estudos seguintes com PMA19 foram conduzidos com a concentração de 10^{-9} M, uma vez que, somente nesta concentração houve aumento do influxo de cálcio (Fig. 37 C). Esta concentração também foi utilizada para os estudos seguintes com o estradiol. Ainda, os resultados obtidos para PMA19 e Estradiol apresentam um efeito que é dependente do tempo. Portanto, foi estabelecido o tempo de 10 min para os estudos posteriores, que coincide com a primeira fase de secreção de insulina.

Figura 37 – Curva de tempo de PMA19 (A), Estradiol (B) e concentração-resposta (C) de PMA19 no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.

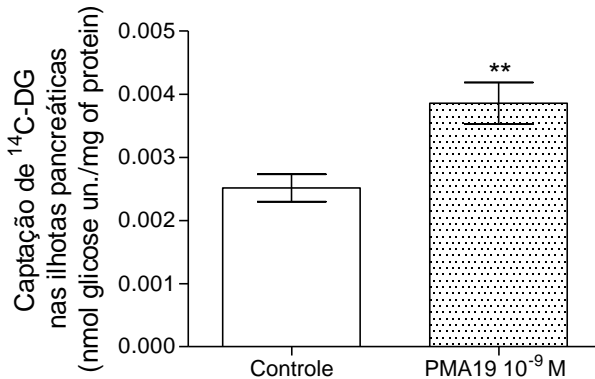


Pré-incubação= 60 min; Incubação= 0 a 15 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.3.5 Efeito da PMA19 na captação de ^{14}C -glicose em ilhotas pancreáticas de rato *in vitro*

A Figura 38 apresenta o efeito de PMA19 na captação de glicose em ilhotas pancreáticas. Houve um aumento de aproximadamente 56% na captação de glicose quando as ilhotas foram tratadas com PMA19 (10^{-9} M).

Figura 38 - Curva de concentração de PMA19 no estímulo da captação de $^{14}\text{C-DG}$ nas ilhotas pancreáticas



Pré-incubação= 30 min; Incubação= 60 min. Valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6. ** $P \leq 0,01$; comparado ao grupo controle.

5.3.6 Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA19 e Estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas

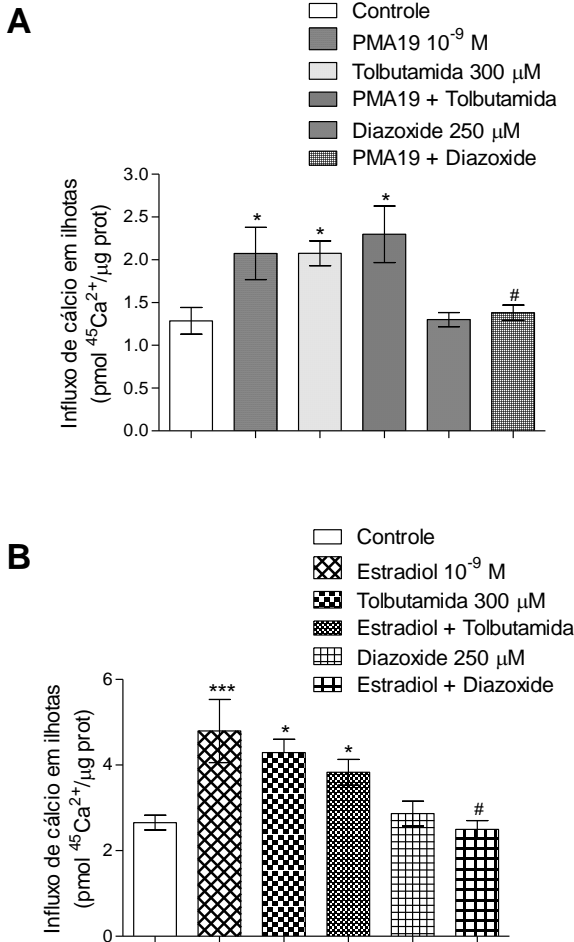
Os K^+_{ATP} tem um importante papel na secreção de insulina. Para estudar o envolvimento destes canais na atividade estimulatória de PMA19 e Estradiol, foi utilizado a tolbutamida, que fecha canais de potássio, permitindo a despolarização essencial para a secreção de insulina, e o diazoxide, que impede o fechamento dos canais de potássio, impedindo a despolarização proporcionada pela tolbutamida e glicose por exemplo.

Pode ser observado na Figura 39 A e B, que tanto PMA19 quanto o estradiol aumentaram o influxo de cálcio quando comparado com o controle. Além disso, em ambos os gráficos, como esperado, a tolbutamida aumentou o influxo de cálcio. Quando tolbutamida foi co-

incubada com PMA19 ou Estradiol, este aumento da captação se manteve, sem efeitos adicionais.

Ainda, pode ser observado que o diazoxide não alterou a captação basal de cálcio, porém quando incubado juntamente com PMA19 e Estradiol, o efeito de ambos foi bloqueado, mostrando o envolvimento destes canais no estímulo para o influxo de cálcio.

Figura 39 – Envolvimento de canais de K^+_{ATP} no efeito estimulatório de PMA19 e Estradiol no influxo de $^{45}Ca^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.



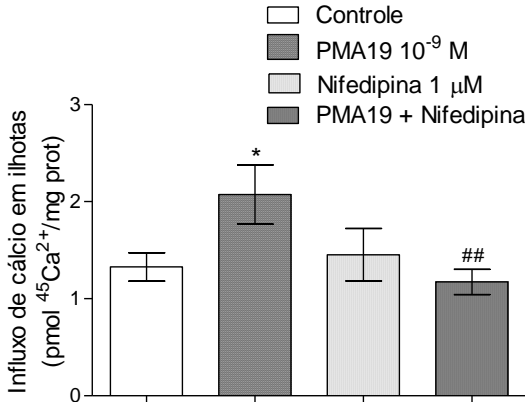
Tolbutamida (300 μ M) e diazoxide (250 μ M) presentes durante 15 minutos da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; Incubação= 10 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6. *** $P \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo PMA19 (A) ou estradiol (B).

5.3.7 Envolvimento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$

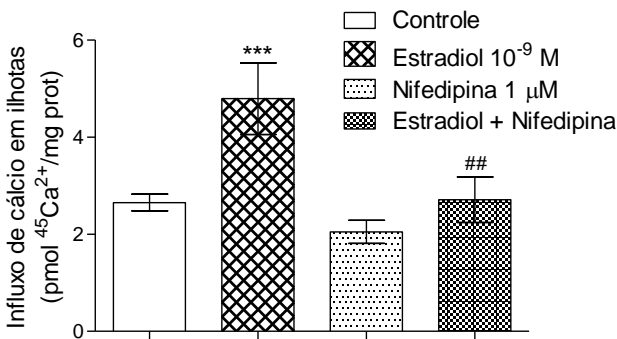
O envolvimento do cálcio na secreção de insulina é bem conhecido. Apresentado na Figura 40 A e B, se observa que na presença da nifedipina, inibidor dos canais de cálcio dependentes de voltagem, não há alteração no influxo basal de cálcio. No entanto, a nifedipina bloqueou significativamente o influxo de cálcio mediado por PMA19 e estradiol (Fig. 40 A e B, respectivamente).

Figura 40 – Envolvimento do VDCC-L no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas

A



B

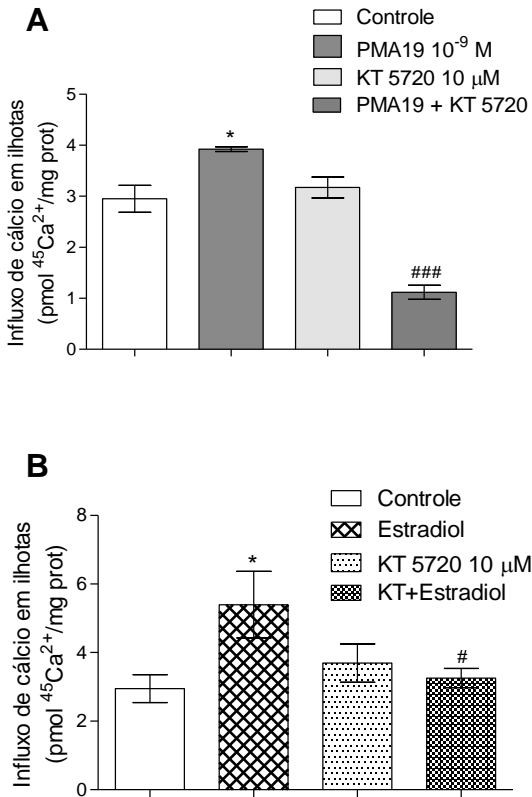


Nifedipina ($1 \mu\text{M}$) presente durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos como a média \pm E.P.M.; $n=6$. *** $P \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$, comparado ao grupo controle. ## $p \leq 0,01$ comparado com grupo PMA19 (A) e estradiol (B).

5.3.8 Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Como pode ser observado na Figura 41, o efeito de PMA19 (Fig. 41 A) e estradiol (Fig. 41 B) foi suprimido na presença do inibidor KT 5720. A presença do inibidor não alterou a captação basal de cálcio.

Figura 41 - Envolvimento da PKA no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$



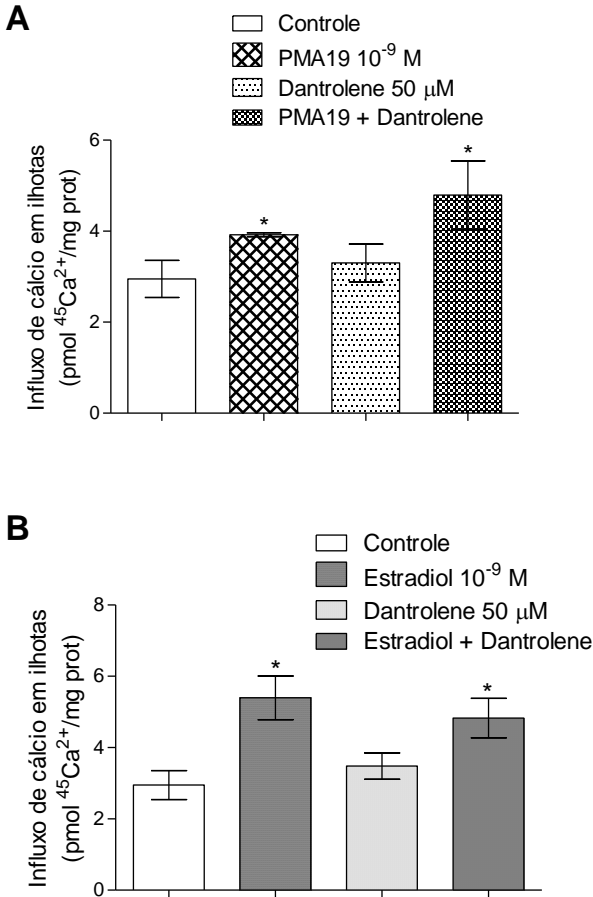
KT5720 ($10 \mu\text{M}$) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6. * $P \leq 0,05$, comparado ao grupo controle. # $P \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ comparado com grupo PMA19 (A) e estradiol (B).

5.3.9 Envolvimento do cálcio dos estoques no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Com o objetivo de investigar se o PMA19 e o estradiol afetam a mobilização de cálcio dos estoques intracelulares, foi utilizado um inibidor dos receptores de rianodina, envolvidos com a ativação e liberação de cálcio advindo de estoques do retículo endoplasmático.

De acordo com o observado na Figura 42, o dantrolene, nas concentrações utilizadas, não afetou o influxo basal de cálcio. PMA19 (Fig. 42 A) e o estradiol (Fig. 42 B), quando co-incubados com dantrolene mantiveram seu efeito, aumentando o influxo de cálcio em relação ao controle.

Figura 42 - Envolvimento de estoques de cálcio no efeito estimulatório de PMA19 e estradiol no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

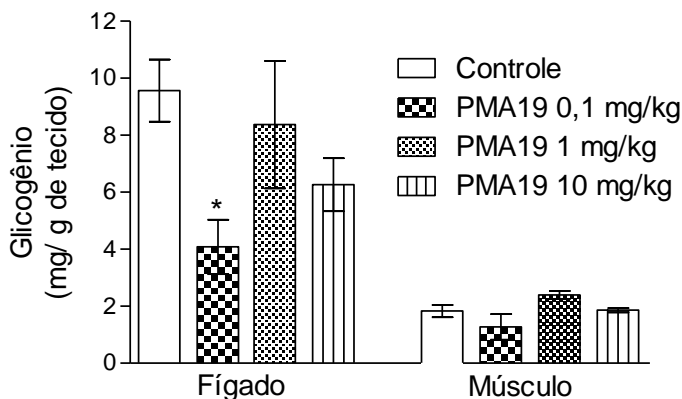


Dantrolene (50 μM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos em média \pm E.P.M.; n= 6. * $P \leq 0,05$, comparado ao grupo controle. PMA19 (A) e estradiol (B).

5.3.10 Efeito agudo de PMA19 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A isoflavona PMA19 não apresentou efeito no conteúdo de glicogênio hepático nas concentrações de 1 e 10 mg/kg. Contrariamente, foi observado uma redução no conteúdo de glicogênio hepático na concentração de 0,1 mg/kg (Fig. 43). Não foram observadas alterações no glicogênio muscular em todas as doses avaliadas.

Figura 43 - Efeito agudo de PMA2.31 no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

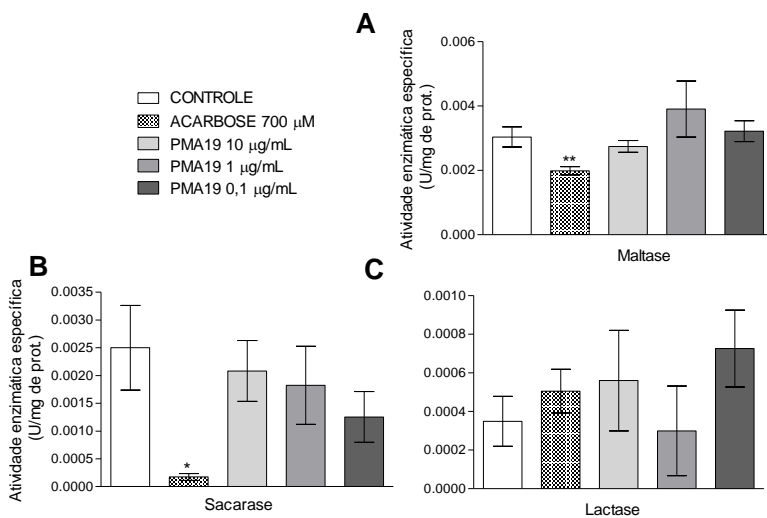


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.3.11 Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo* e *in vitro*

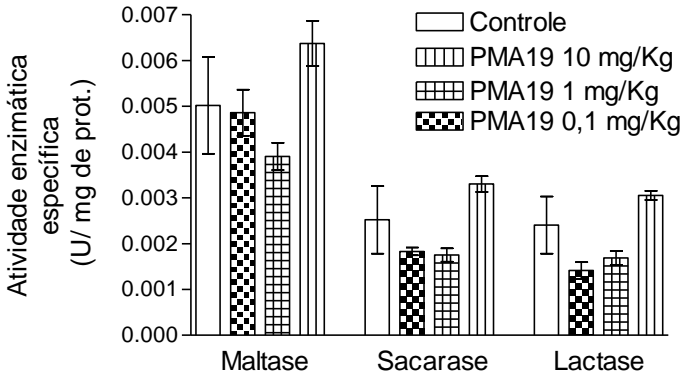
Quando a atividade de dissacaridases foi avaliada *in vitro*, nenhuma das doses de PMA19 inibiu a atividade enzimática quando comparadas ao controle. (Fig. 44). A acarbose, utilizada como controle positivo, apresentou o efeito clássico inibindo atividade de maltase e sacarase, sem efeitos sobre lactase. Da mesma forma PMA19 não apresentou nenhum efeito na atividade de maltase, sacarase e lactase, quando realizado tratamento *in vivo* (Fig. 45).

Figura 44 - Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais *in vitro*



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Figura 45 - Efeito de PMA19 na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*

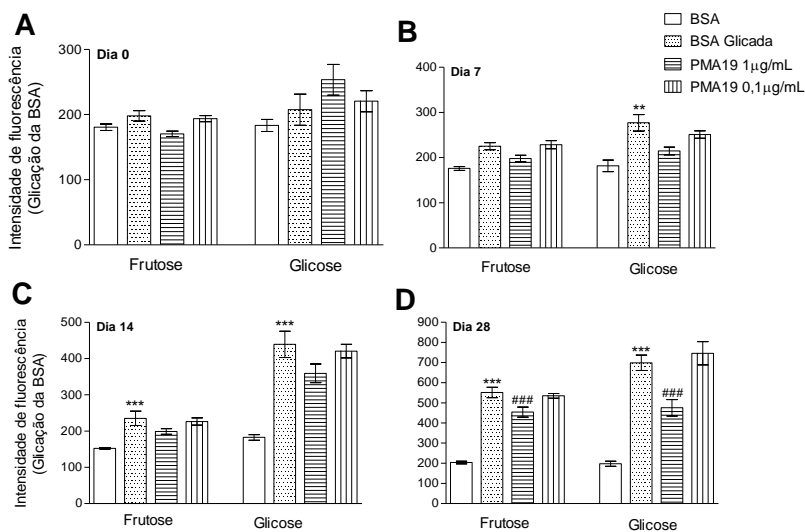


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5

5.3.12 Efeito de PMA19 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

A Figura 46 apresenta os efeitos inibitórios de PMA19 na glicação de albumina (BSA) com glicose e frutose. No dia zero (Fig. 46 A), como esperado, não houve diferenças entre os grupos. Apenas foi observado o aumento da glicação após 7 dias para a glicose (Fig. 46 B) e após 14 dias para a frutose (Fig. 46 C) quando comparado com o grupo BSA. Decorridos 14 dias de incubação, não se observou nenhum efeito de PMA19 na redução da glicação da albumina. No entanto, após 28 dias o PMA19 reduziu significativamente a glicação quando comparado com o grupo BSA glicada. Esta redução ocorreu com glicose e frutose, na concentração de 1 μ g/mL (Fig. 46 D).

Figura 46 - Efeito inibitório de PMA19 na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

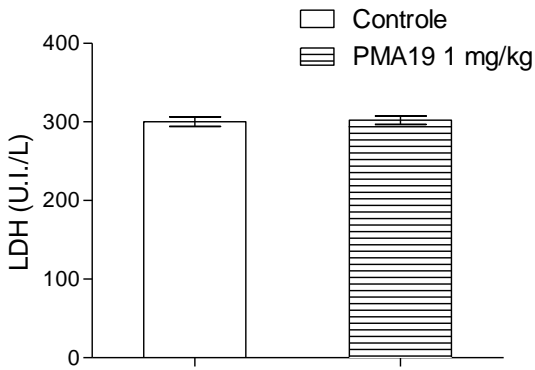
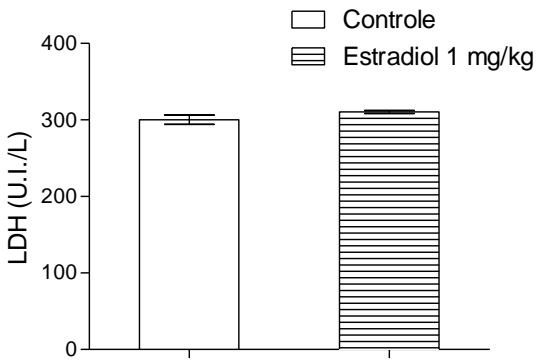


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n=6$. ** $P \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. ### $P \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

5.3.13 Efeito de PMA19 na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH)

A medida do LDH sérico foi utilizada como indicador de toxicidade do composto. Como observado na Figura 47, PMA19 e o estradiol não alteraram a concentração de LDH sérico após 3h de tratamento.

Figura 47 - Efeito de PMA19 na concentração de LDH

A**B**

Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5.

6. DISCUSSÃO

Apesar das descrições e da presença de inúmeras classes de compostos ativos já isolados do gênero *Polygala*, como xantonas, cumarinas, flavonoides, saponinas, terpenoides, e infreqüentemente isoflavonas, algumas espécies de ocorrência brasileira foram pouco estudadas quanto às propriedades biológicas. Na literatura, não se encontram estudos sobre atividade anti-hiperglicêmica da *P. molluginifolia*. Porém, em um estudo desenvolvido por Arruda-Silva et al. (2014), o extrato e frações de *P. molluginifolia*, apresentaram um potencial efeito anti-inflamatório. Este efeito foi atribuído à presença de isoflavonas e rutina, compostos majoritários no extrato.

Entretanto, outras espécies estudadas apresentam importantes efeitos antidiabéticos. Dentre estas, a *P. rosmarinifolia* foi eficiente na redução da glicemia de ratos diabéticos induzidos por alloxano. A *Polygala senega* e *P. erioptera* também reduziram a glicemia em modelo de animal de diabetes tipo 2 e diabetes induzido por alloxano, respectivamente (KAKO et al., 1996; SAMMAIAH & SRIVASTAVA, 2008; ALAGAMMAL et al., 2012b). A *P. javana* mostrou além de uma potencial redução na glicemia de ratos diabéticos, um aumento na secreção de insulina, sendo estes efeitos associados à presença de flavonoides, saponinas, fenóis e terpenos nos extratos analisados. (ALAGAMMAL et al., 2012a).

Embora não existam descrições do uso popular de *P. molluginifolia* para o tratamento da diabetes, a presença de isoflavonas despertou o interesse deste estudo, uma vez que, as isoflavonas estão associadas a inúmeros efeitos medicinais, incluindo antidiabéticos. Esta classe de compostos é conhecida por efeitos fitoestrógenos, devido à

semelhança estrutural com estrogênios endógenos, porém diferenciados por não possuir uma estrutura esteroidal (MORAN et al., 2013).

Entretanto, embora relatos da literatura mostrem importantes atividades biológicas de várias espécies do gênero *Polygala*, neste estudo apenas foram realizados experimentos com a fração acetato de etila de *P. molluginifolia*. Ambas as isoflavonas (PMA2.31 e PMA19) estudadas foram isoladas da fração acetato de etila (PMFA) das partes aéreas de *P. molluginifolia*. PMA2.31 e PMA19 compõem majoritariamente a fração acetato de etila.

Porém, não foram realizados estudos com o extrato bruto da planta, pois estes isolamentos ficaram restritos a uma coleta da planta em local específico. Ainda, PMA2.31 é uma estrutura inédita na literatura, descrita recentemente pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (UFSC) (Venzke *et al.*, 2013). Dessa forma, os resultados observados não foram atribuídos a um efeito de *P. molluginifolia*, mas relacionados à presença das isoflavonas encontradas no extrato da mesma.

Os resultados obtidos com a fração acetato de etila demonstram um potencial efeito anti-hiperglicêmico da fração. Este efeito perdurou após 60 min da sobrecarga de glicose, o que demonstra uma eficiente capacidade de manter um controle da glicemia, mesmo em tempo agudo. Este pode ter sido mediado, em parte, pela inibição de dissacaridasas observada *in vitro*.

Além do efeito anti-hiperglicêmico, a fração acetato de etila reduziu a glicação da albumina com frutose e glicose, considerado um potencial efeito antidiabético. Até o momento, não se encontram estudos na literatura que demonstrem a atividade anti-hiperglicêmica da espécie

de *P. molluginifolia*, embora outras espécies demonstrem possuir um potencial terapêutico para o tratamento da doença. Entre as *P. senega* se destaca por ser uma das plantas comumente associadas a efeitos hipoglicêmicos em período agudo de tratamento em dose semelhante à utilizada neste estudo (2,5 mg/kg). (KAKO et al., 1995; KAKO et al., 1996; PATEL et al., 2012). No entanto, os efeitos foram atribuídos à presença majoritária de triterpenos.

Neste estudo, no entanto, a presença majoritária de isoflavonas pode ser atribuída aos efeitos observados, pois muitas descrições apontam que as isoflavonas são fontes terapêuticas potenciais para o tratamento da diabetes. Dentre estas, destaca-se a genisteína, uma isoflavona extraída do soja, que apresenta potenciais efeitos anti-hiperglicêmicos e antidiabéticos, associados a ações em múltiplos alvos (GILBERT; LIU, 2013).

Para tanto, a ação das isoflavonas PMA2.31 e PMA19, constituintes majoritários da fração acetato de etila de *P. molluginifolia*, foram estudadas a fim de elucidar a participação destes compostos nas atividades observadas, bem como, aprofundar o estudo de mecanismos de ação em diferentes tecidos.

Quando PMA2.31 foi avaliada no teste de tolerância oral à glicose, demonstrou uma eficiente redução na glicemia. De maneira semelhante à fração acetato de etila e a glicizada, este efeito se manteve dos 30 aos 60 min após a sobrecarga de glicose. Poucos estudos demonstram os efeitos agudos de isoflavonas no teste de tolerância oral a glicose em ratos normoglicêmicos. Em um estudo conduzido por Carlson et al., (2014), camundongos normoglicêmicos tratados com o extrato de *Radix puerariae* apresentaram uma significativa redução da

glicemia após teste de tolerância oral à glicose. Estes resultados formam atribuídos à isoflavona puerarina presente no extrato.

A redução glicêmica promovida por PMA2.31 primeiramente foi atribuída a um efeito secretagogo de insulina, uma vez que, promoveu um aumento da concentração sérica de insulina após 30 min da sobrecarga de glicose, coincidindo com o tempo de início da ação de PMA2.31 na redução da glicemia. Este efeito estimulatório da secreção de insulina é bem descrito para algumas isoflavonas, incluindo a genisteína (LIU et al., 2006).

Os mecanismos pelos quais a genisteína e outras isoflavonas induzem a secreção de insulina envolvem o aumento de AMPc intracelular e ativação da proteína PKA. Esta ação despertou o interesse de estudo em alvos do eixo êntero-insular, pois a ativação de mecanismos semelhantes demonstra ativar a secreção das incretinas, entre estas o GLP-1 (LIU et al., 2006; GILBERT; LIU, 2013).

Esta hipótese foi reforçada, após os estudos conduzidos com sitagliptina mostrarem um efeito adicional na redução da glicemia quando PMA2.31 e sitagliptina foram utilizados conjuntamente, além de PMA2.31 promover isoladamente um perfil de redução glicêmica semelhante ao da sitagliptina. Ainda, o aumento sérico de GLP-1 estimulado por PMA2.31 corrobora com a possibilidade de PMA2.31 agir como secretagogo de GLP-1 e/ou através da inibição de DPP-IV, promovendo desta forma, o incremento sérico de GLP-1, que por sua vez, age na célula β -pancreática aumentando a secreção de insulina. Estes dados apontam pela primeira vez, a atividade de isoflavonas no aumento de GLP-1, utilizando modelo experimental *in vivo*.

Quando analisada a atividade de DPP-IV foi observado que o aumento de GLP-1 pode ser decorrente, em parte, da capacidade de PMA2.31 inibir DPP-IV. Embora a sitagliptina tenha mostrado maior efetividade na inibição de DPP-IV com concentrações na ordem de nM, a isoflavona PMA2.31 apresentou uma eficiente inibição em concentrações maiores (50%). Entretanto, esta atividade parece ser parcial, uma vez que, após 30 min ocorreu um decréscimo dos níveis de GLP-1.

Estes resultados corroboram com os estudos desenvolvidos por Fan et al. (2013), que mostram que a genisteína é capaz de inibir DPP-IV, de maneira intermediária. Além disso, este estudo aponta que as hidroxilas presentes no carbono 4' do anel B da genisteína parecem ser importantes pontos de ligação à regiões da enzima DPP-IV. Esta hidroxila também está presente em PMA2.31, além de uma segunda hidroxila ligada ao carbono 3' do mesmo anel.

Além disso, estes dados assinalaram que a inibição de DPP-IV poderia não ser a única via pela qual PMA2.31 atua. Dessa forma, os estudos subsequentes foram conduzidos a fim de avaliar a atividade de PMA2.31 na secreção de GLP-1. Os resultados obtidos demonstraram que PMA2.31 aumenta o influxo de cálcio em fatias de intestino, evento considerado essencial para a exocitose de vesículas contendo GLP-1. Embora, este efeito tenha sido pela primeira vez demonstrado para PMA2.31, outros estudos, demonstram que a isoflavona genisteína é capaz de aumentar a secreção de GLP-1 em cultura de células enteroendócrinas (KWON et al., 2011).

A ativação de vários substratos intracelulares pode aumentar a secreção de GLP-1, a partir da sinalização mediada por diferentes

receptores membranares. Baseado nestas indicações, o mecanismo estimulatório de PMA2.31 no influxo de cálcio foi investigado. Uma das vias de ativação da secreção de GLP-1 envolve o fechamento de canais de K^+_{ATP} mediado principalmente pela entrada de glicose, cujo metabolismo, eleva a relação ATP/ADP e inibe canal de K^+_{ATP} . A despolarização decorrente desta ação abre canais de cálcio e consequentemente permite a mobilização do cálcio para o espaço intracelular (BALK-MOLLER, HOLST; KUHRE, 2014). PMA2.31 demonstrou não agir através no canal de K^+_{ATP} , pois quando co-incubado com diazoxide, manteve este aumento do influxo de cálcio. Da mesma forma, quando a tolbutamida foi utilizada, nenhum efeito adicional foi observado, mostrando que mesmo inibindo ou ativando uma despolarização através do canal de K^+_{ATP} não houve mudança no perfil de influxo de cálcio estimulado por PMA2.31.

Quando utilizada a nifedipina, um inibidor de canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L, o aumento do influxo de cálcio promovido por PMA2.31 persistiu, reforçando que este canal de cálcio parece não participar deste efeito. Da mesma forma, quando utilizado um quelante de cálcio intracelular, a atividade de PMA2.31 não foi alterada, indicando a possível ausência da mobilização de cálcio interno neste mecanismo. A inibição de PKA também não produziu alterações no efeito de PMA2.31, no entanto, quando um inibidor (ST) de PKC foi utilizado, a estimulação de PMA2.31 foi suprimida. Adicionalmente, após utilizar o ativador de PKC, éster de forbol (E-forbol), o efeito de PMA2.31 foi somatório quando co-incubados ativador e a isoflavona. Estes resultados demonstraram pela primeira vez que o efeito de PMA2.31 na secreção de GLP-1 pode ser mediado pela PKC.

A PKC pertence a uma família de proteínas serina/treonina cinases específicas, formada por 11 isoenzimas envolvidas em diversas respostas biológicas, envolvendo a crescimento e diferenciação celular e a maquinaria excitotóxica em vários tecidos. A PKC pode ser ativada por diversos substratos intracelulares, pois existem diferentes isoformas, que incluem as PKCs ativadas por cálcio, segundos mensageiros lipídicos, entre outros. (BRANDLIN et al., 2002; RAJAGOPAL; FIELDS; KAMATCHI, 2014).

Nas células L, a ativação de PKC pode ocorrer via ativação mediada por segundos mensageiros lipídicos. Os ácidos graxos agem através deste mecanismo promovendo a secreção de GLP-1 mediante interação a subtipo de proteína G específico, acoplado a ativação de fosfolipase C e sequente conversão de PIP2 em IP3 e DAG. DAG promove a ativação de PKC e esta, a exocitose de GLP-1 (BALK-MOLLER; HOLST, KUHRE, 2014).

Este parece ser o mecanismo pelo qual PMA2.31 age, embora, também poderia induzir a ativação direta de PKC, uma vez que, ativa PKC porém, não parece mobilizar cálcio interno. Este dado aponta que PKC é ativada por outro segundo mensageiro podendo ser, por exemplo, o DAG.

Ainda, alguns estudos mostram que PKC pode modular vários subtipos de canais de cálcio (YANG; BERGGREN, 2006). Dessa forma, o influxo de cálcio induzido por PMA2.31 pode ocorrer via ativação de PKC e modulação de canal de cálcio, bem como, via ativação direta do canal. Porém, os canais de cálcio do tipo L parecem não estar envolvidos nesta modulação, devido a manutenção do efeito de PMA2.31, quando bloqueado canal de cálcio do tipo L com nifedipina.

Canais de cálcio do tipo T e/ou tipo P/Q podem estar envolvidos, uma vez que, são comprovadamente expressos em células enteroendócrinas secretoras de GLP-1 (ROGERS et al., 2011).

Também foi investigada a ação de PMA2.31 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, a fim de estabelecer se PMA2.31 pode isoladamente estimular o influxo de cálcio e sequente secreção de insulina. Os resultados mostraram que PMA2.31 não promove aumento no influxo de cálcio em ilhotas, o que reforça a hipótese de que a secreção de insulina observada, é apenas mediada pela elevação de GLP-1 promovida por PMA2.31.

Ainda, o aumento no conteúdo de glicogênio hepático promovido por PMA2.31 pode ser uma das ações que mantêm a redução glicêmica após 30 min, uma vez que, não se observou aumento das concentrações séricas de insulina e GLP-1 após este período, porém houve manutenção do efeito anti-hiperglicêmico de PMA2.31 nos 60 min após a sobrecarga de glicose. Hamden et al. (2011) também demonstraram que isoflavonas extraídas da soja promovem um aumento do conteúdo de glicogênio muscular, embora outros estudos apontem que extrato de soja fermentada restaura o conteúdo de glicogênio muscular, sem alterar glicogênio hepático em modelo animal de diabetes (MALARDE et al., 2013).

Os resultados da avaliação da atividade de dissacaridasas intestinais revela outro alvo que pode contribuir com a manutenção e potencial ação anti-hiperglicêmica de PMA2.31. De maneira semelhante à acarbose, a atividade inibitória de PMA2.31 também se restringe a α -glicosidasas, pois nenhuma alteração foi observada na atividade de lactase. Este dado é positivo devido ao fato da ausência de atividade

sobre lactase não promover um efeito colateral previsível que seria a intolerância à lactose. Ainda, diversamente ao observado para a fração acetato, o efeito inibitório de PMA2.31 na atividade de maltase foi reproduzido também *in vivo*.

A ação de inibitória de isoflavonas na atividade de α -glicosidases é bem documentada. Estudos demonstram a potencial atividade inibitória de isoflavonas como a genisteína, formononetina, biochanina A, daidzeína, entre outras, em ensaios *in vitro* (LEE; LEE, 2001; CHOI et al., 2010). Alguns estudos também relacionam a ação de inibidores de α -glicosidases, com a secreção de GLP-1. A acarbose, por exemplo, promove aumento da secreção de GLP-1 (HOLST, 2007).

As isoflavonas também estão associadas à regulação da produção de AGES. PMA2.31 também reduziu a glicação com frutose, embora nenhum efeito tenha sido observado na glicação com glicose, nas concentrações avaliadas. Em um estudo conduzido por Silvan et al. (2014), isoflavonas reduziram significativamente a glicação de proteínas. O mecanismo pelo qual as isoflavonas agem parece ser através da ligação a pontos-chaves de ligação de carboidratos com proteínas, como os grupamentos amino livres, formando um complexo isoflavona-proteína, que impede a sequência de reações para formação de AGES.

O uso de isoflavonas é descrito como altamente seguro. Algumas isoflavonas, estão comumente presentes na dieta, principalmente através do consumo de produtos derivados do grão soja, entre outras leguminosas (MUNRO, et al., 2003; FAQI, et al., 2004). Alguns estudos utilizam a avaliação da enzima lactato desidrogenase (LDH) como marcadora de toxicidade. A LDH é uma enzima citosólica, portanto,

elevados níveis séricos da enzima podem indicar dano celular. (PEDROSA, 2013). A avaliação da concentração sérica de LDH foi utilizada como um indicador de toxicidade de PMA2.31. Após 3,5 horas de tratamento, PMA2.31 não alterou a concentração sérica de LDH, demonstrando um perfil atóxico da isoflavona PMA2.31.

O perfil de atividade da isoflavona PMA19 diferiu do observado para PMA2.31. Os resultados mostraram que PMA19 pode agir de forma semelhante à genisteína, além de demonstrar em alguns pontos, algumas ações características do estradiol. As atividades antidiabéticas da genisteína são principalmente atribuídas a um efeito estrogênico. Dessa forma, alguns resultados obtidos com PMA19 foram comparados com efeitos do estradiol, a fim de verificar se PMA19 também age através de uma atividade fitoestrógena característica.

A PMA19 apresentou uma redução significativa da glicemia após período agudo de tratamento. Em um estudo realizado por Carlson et al., 2014, resultados semelhantes foram encontrados com extrato de *Radix puerariae*, no qual é encontrado a isoflavona puerarina. Uma suplementação com genisteína também melhora o controle glicêmico, além dos níveis de insulina (FU et al., 2012).

No entanto, estudos realizados com extrato de *Pueraria candolei*, espécie vegetal rica em isoflavonas genisteína e puerarina não reduziram a glicemia após período agudo de tratamento em animais normais, embora em animais diabéticos estas reduções tenham ocorrido a partir de 14 dias de tratamento (KHITKA et al., 2009). A divergência nestas respostas pode ser decorrente da variabilidade de dose e concentrações utilizadas. Segundo Gilbert e Liu (2013) as respostas de isoflavonas, como a genisteína, podem variar muito dependendo do modelo animal

utilizado, metodologia, bem como, das concentrações e períodos de tratamentos estabelecidos nos estudos.

A manutenção e o potencial efeito anti-hiperglicêmico após os 15 min da sobrecarga de glicose, fez com que os estudos subsequentes fossem conduzidos com a concentração de 1 mg/kg de PMA19. Na mesma dose, o estradiol não produziu alteração na glicemia. Existem poucos estudos que demonstram a ação aguda do estradiol. Alonso et al. (2010) demonstraram que após 1h de tratamento o estradiol não altera a glicose de jejum em ratas ovariectomizadas.

Os resultados da atividade anti-hiperglicêmica corroboram com os níveis de insulina encontrados, pois PMA19 aumentou a secreção de insulina após 15 min da sobrecarga de glicose. A genisteína induz a secreção de insulina e este efeito é associado às ações estrogênicas da isoflavona (Gilbert e Liu, 2013). Estes dados, aliados a ausência de efeito observada no teste de tolerância oral à glicose quando PMA19 foi combinada com sitagliptina, bem como, a concentração sérica inalterada de GLP-1, revelou a hipótese de que PMA19 poderia apresentar um papel estrogênico, aumentando a secreção de insulina. Dessa forma, os estudos posteriores focaram na ação de PMA19 em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.

O aumento de cálcio intracelular é um evento primordial para a secreção de insulina das células β -pancreáticas. Dessa forma, a ação de PMA19 no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas foi estudada. Os resultados demonstraram que a PMA19 e o Estradiol agem aumentando o influxo de cálcio após 10 min, correspondente a primeira fase de secreção de insulina. Estes dados são semelhantes ao aumento sérico de insulina observado após tratamento *in vivo* com PMA19.

O efeito de isoflavonas na secreção de insulina é cientificamente comprovado mediante vários estudos, realizados principalmente com a genisteína, que estimula a secreção de insulina em ilhotas de ratos, camundongos e em outras linhagens de células de insulinoma (Gilbert e Liu, 2013).

Ainda, a PMA19 aumentou a captação de glicose em ilhotas pancreáticas demonstrando um possível efeito no metabolismo da glicose. Considerando que a secreção de insulina promovida por glicose, gera aumento da relação ATP/ADP intracelular e sequente bloqueio dos canais de K^+_{ATP} , um estímulo para a captação e/ou metabolismo da glicose pode estimular a secreção de insulina. Dessa forma, estes resultados corroboram com o bloqueio do efeito estimulatório de PMA19 no influxo de cálcio quando utilizado o diazoxide, um agonista canais de K^+_{ATP} , impedindo a sequencia de eventos para a secreção de insulina. No entanto, este efeito também pode ser decorrente da ação de PMA19 no próprio canal de K^+_{ATP} . O efeito do estradiol nos canais de K^+_{ATP} já foi reportado em outros estudos (SORIANO et al., 2009; SORIANO et al., 2011). Contrariamente, a ação da genisteína, a isoflavona mais estudada quanto às atividades antidiabéticas, parece não afetar o metabolismo da glicose e independe do canal de K^+_{ATP} (FU; LIU, 2009).

Entretanto, não foram observados efeitos adicionais quando PMA19 e estradiol foram co-incubados com tolbutamida, fármaco que age bloqueando canais de K^+_{ATP} , promovendo um efeito na secreção de insulina. Estes dados podem reforçar a hipótese de que a ação de PMA19 pode ser mediada via metabolismo ou ação direta no canal de K^+_{ATP} .

Ainda, estes dados corroboram com os obtidos quando foi utilizado um inibidor dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L. O efeito de PMA19 e do Estradiol foi suprimido na presença da nifedipina, mostrando que este canal também é importante nesta ação. O efeito sobre canal de cálcio pode ter sido mediado pela ativação de PKA, pois PKA também demonstrou ser importante na atividade de PMA19 e estradiol, devido ao bloqueio do influxo de cálcio quando utilizado o KT, um inibidor de PKA.

A PKA é uma proteína heterotetramérica ativada por AMPc, com duas subunidades, que após ativadas podem migrar para a membrana e modular canais de cálcio do tipo L (LIU et al., 2006). Alguns estudos apontam que o mecanismo pelo qual as isoflavonas exercem os efeitos na secreção de insulina ocorre via ativação de PKA e este caracteriza o efeito estrogênico das isoflavonas, uma vez que, o mesmo ocorre via interação com receptor de estradiol, responsável por respostas insulínótropicas rápidas e não-genômicas do estradiol.

Este receptor é nomeado como GPR30 e é genuinamente responsivo aos estrogênios, além de pertencer à família de receptores acoplados a proteína G (ROPERO et al., 2012). Entretanto, outros trabalhos demonstram que o receptor ER β e α também são responsivos a ação de isoflavonas e também parecem mediar o efeitos para a secreção de insulina (NADAL et al., 2011). A interação com o receptor promove aumento de AMPc e por consequência ativa PKA. Além do estradiol, a genisteína também pode atuar neste canal (LIU et al., 2006; GILBERT; LIU, 2013). Ainda, a isoflavona PMA19 e o estradiol não apresentaram efeitos na mobilização de cálcio intracelular. Esta ação foi evidenciada devido à inalteração do influxo de cálcio quando utilizado o dantrolene,

um inibidor dos canais de rianodina, envolvidos na liberação de cálcio dos estoques intracelulares.

Diferente do observado com a isoflavona PMA2.31, a isoflavona PMA19 não alterou o conteúdo de glicogênio hepático, exceto na concentração de 0,1 mg/kg, que apresentou uma redução, apontando um efeito que pode ser adverso ao efeito anti-hiperglicêmico de PMA19.

Também, a PMA19 não modificou a atividade das enzimas maltase, sacarase e lactase. Estes dados demonstram que a ação inibitória da fração acetato de etila pode ser decorrente somente da presença de PMA2.31 no extrato.

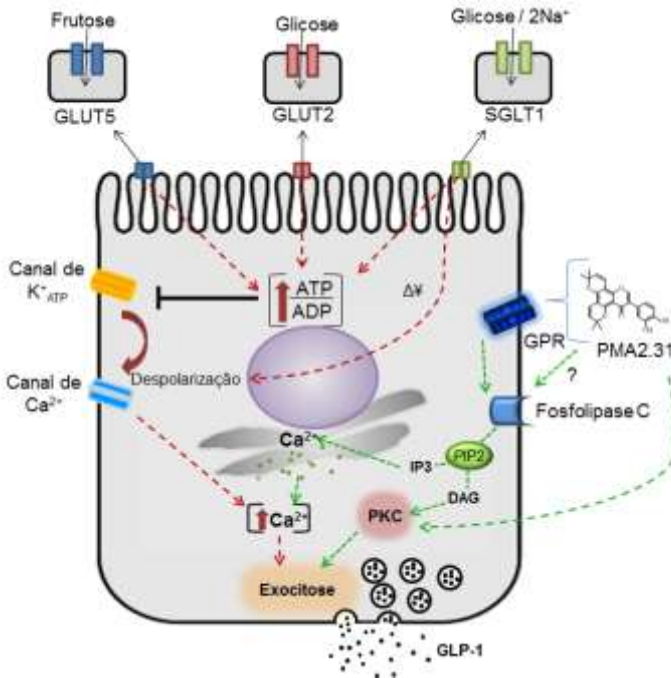
No entanto, a isoflavona PMA19 exibiu uma atividade anti-glicação tanto com glicose, quanto com frutose, apontando uma ação antidiabética também nos eventos tardios associados à doença. PMA19 não alterou a concentração sérica da LDH, assinalando a ausência de toxicidade do composto durante o período de tratamento.

7. CONCLUSÕES

A fração acetato de etila e as isoflavonas PMA2.31 e PMA19 reduziram a glicemia em período agudo de tratamento, demonstrando um potencial efeito anti-hiperglicêmico. Ainda, PMA2.31 aumentou o conteúdo de glicogênio hepático. As isoflavonas PMA2.31 e PMA19 também estimularam a secreção de insulina nos tempos 30 e 15 min após a sobrecarga de glicose, respectivamente. Este efeito foi mediado por vias distintas. PMA2.31 aumentou a concentração sérica de GLP-1, enquanto que PMA19 não apresentou este efeito. Além disso, PMA2.31 inibiu parcialmente a atividade de DPP-IV, mecanismo que pode ter contribuído para o aumento de GLP-1 sérico.

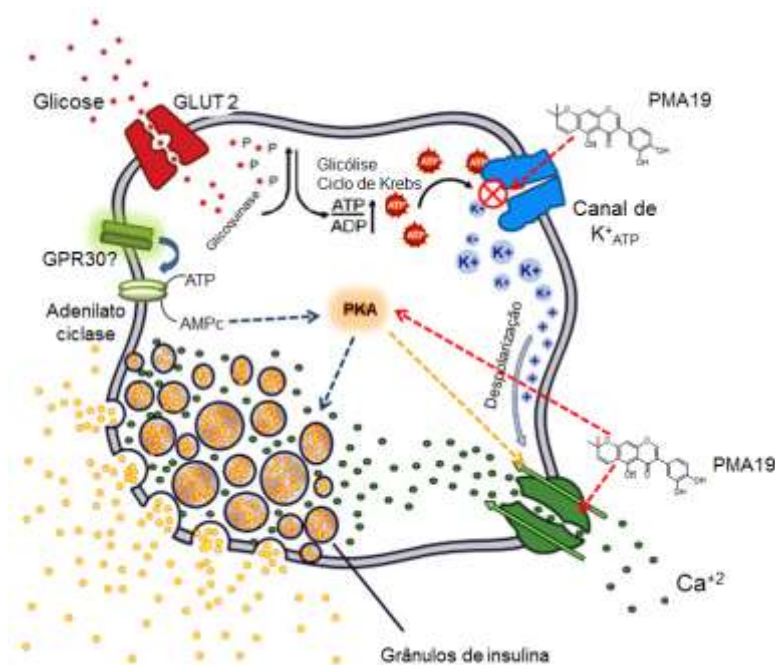
No entanto, PMA2.31 aumentou o influxo de cálcio em fatias do cólon intestinal, demonstrando estimular a secreção de GLP-1. O mecanismo pelo qual PMA2.31 age no intestino, parece envolver a fosfolipase C e consequente ativação direta ou indireta de PKC (Fig. 48), sem envolvimento de cálcio advindo dos estoques intracelulares. A secreção de insulina é estimulada indiretamente por PMA2.31, uma vez que este aumenta a secreção e/ou disponibilidade de GLP-1, porém isoladamente não influencia na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas, sendo este efeito promovido por GLP-1.

Figura 48 – Hipótese para mecanismo de ação de PMA2.31 no influxo de cálcio no intestino



A isoflavona PMA19, aumentou o captação de glicose e o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, demonstrando ação semelhante a genisteína e ao estradiol, podendo dessa forma, exercer uma ação fitoestrógena na secreção de insulina. O mecanismo de PMA19 no aumento do influxo de cálcio envolve ação em canais de K⁺ ATP, canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e através de ativação de PKA (Fig. 49).

Figura 49 - Hipótese para o mecanismo de ação de PMA19 no influxo de cálcio no intestino



Adicionalmente, outras ações importantes foram observadas. A fração acetato de etila e PMA2.31 apresentaram efeito inibitório na atividade de maltase, ações que podem ter contribuído para o efeito anti-hiperglicêmico observado. Ainda, fração acetato de etila, PMA2.31 e PMA19 reduziram a formação de AGES, evidenciando um importante alvo terapêutico antidiabético, também nas complicações tardias do diabetes.

Ambas as isoflavonas não exibiram sinais de toxicidade durante o tempo de tratamento, por não alterarem os níveis plasmáticos de LDH.

Dos resultados *in vivo* e *in vitro* aqui apresentados, este estudo caracterizou pela primeira vez o efeito anti-diabético agudo e o

mecanismo de ação destas isoflavonas. O efeito secretagogo de GLP-1 e de insulina, bem como, a ação metabólica na captação de glicose, o aumento de glicogênio em tecido alvo da insulina e a ação inibitória na glicação de proteínas indicam estes compostos como potenciais alvos na terapia da diabetes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 67, n. 1, p. 3-21, 2005.

ALAGAMMAL, M.; AGNEL, R. A.; MOHAN, V. R. Antidiabetic and antihyperlipidaemic effect of *Polygala Javana* DC on alloxan induced diabetic rats. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 3, n.9, p. 231-234, 2012a.

ALAGAMMAL, M.; NISHANTHINI, A.; MOHAN, V. R. Antihyperglycemic and Antihyperlipidaemic effect of *Polygala rosmarinifolia* Wright & Arn on alloxan induced diabetic rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 9, p. 143-148, 2012b.

ALONSO, A. et al. Acute effects of 17 β -estradiol and genistein on insulinsensitivity and spatial memory in aged ovariectomized female rats. **AGE** v.32, p.421- 434, 2010.

ARAÚJO, J. R.; MARTEL, F. Regulação da Absorção Intestinal de Glicose: Uma Breve Revisão. **Arq Med**, v. 23, n. 2, p. 35-43, 2009.

ARONOFF, S. L. et al. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. **Diabetes Spectrum**, v. 17 n. 3, p. 183-190, 2004.

ARRUDA-SILVA, F. et al. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF-kappaB activation. **Int Immunopharmacol**, v. 19, n. 2, p. 334-41, 2014.

BALK-MOLLER, E., HOLST, JENS JUUL, EHRENREICH KUHRE, RUNE. Incretin secretion: direct mechanisms - Metabolism - Diapedia, The Living Textbook of Diabetes, 2014. Disponível em: <http://www.diapedia.org/metabolism/incretin-secretion-direct-mechanisms>. Acesso em: 25/10/2014.

BASTA, G.; SCHMIDT, A.M ; DE CATERINA, R . Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes **Cardiovascular Research**, v.63, p. 582-592, 2004.

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. **Current Paediatrics**, v. 16, n. 6, p. 434–438, 2006.

BILOUS, R.; DONNELLY, R. Handbook of diabetes. Middlesbrough - UK: **Wiley-Blackwell**, 2010. 4 ed., 250p.

BRANDLIN, I. et al. Protein kinase C (PKC) η -mediated PKC μ activation modulates ERK and JNK signal pathways. **J Biol Chem**, v. 277, n. 8, p. 6490-6, 2002.

BROWLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v.414, n 13, p.813-820, 2001.

CALCUTT, N. A. et al. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 5, p. 417-29, 2009.

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.

CARLSON, S. et al. Acute and Chronic Kudzu Improves Plasma Glucose Tolerance in Non-Diabetic CD-1 Mice. **Journal of Endocrinology and Diabetes Mellitus**, v. 2, p. 70-77, 2014.

CASTRO, A. J. G. et al. Betulinic acid and 1,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$ share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 48, n. 0, p. 18-27, 2014.

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 [14 C] glucose uptake. **Chemico-Biological Interaction**, v. 179, n. 2-3, p. 407–412, 2009.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; JORGE, A.P. et al. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: their anti-hyperglycemic potential role in diabete. **Chem. Biol. Interact**, v. 163, p. 177–191, 2006.

CHANG, L.; CHIANG, S. H.; SALTIEL, A. R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. **Mol Med**, v.10, n.7-12, p. 65-71, 2004.

CHIMIANTI, F.; FAVIER, A.; SEVE, M. ZnT-8, a pancreatic beta-cell-specific zinc transporter. **Biometals**, v. 18, n. 4, p. 313-7, 2005.

CHOI, C. W. et al. Yeast alpha-glucosidase inhibition by isoflavones from plants of Leguminosae as an in vitro alternative to acarbose. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 18, p. 9988-93, 2010.

COHEN, P. The twentieth century struggle to decipher insulin signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 867-873, 2006.

COHEN, P.; GOEDERT, M. GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 6, p. 479-487, 2004.

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

DEACON, C. F. Therapeutic strategies based on glucagon-like peptide 1. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2181-9, 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.

DIAKOGIANNAKI, E.; GRIBBLE, F. M.; REIMANN, F. Nutrient detection by incretin hormone secreting cells. **Physiol Behav**, v. 106, n. 3, p. 387-93, 2012.

DIXON, R. A. Phytoestrogens. **Annu Rev Plant Biol**, v. 55, p. 225-61, 2004.

DONATH, M. Y. and HALBAN, P. A. Decreased beta-cell mass in diabetes: significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetologia**, v. 47, p. 581-589, 2004.

DRUCKER, D. J. The biology of incretin hormones. **Cell Metab**, v. 3, n. 3, p. 153-65, 2006.

DUNN, M. F. Zinc-ligand interactions modulate assembly and stability of the insulin hexamer -- a review. **Biometals**, v. 18, n. 4, p. 295-303, 2005.

FAQI, A. S. et al. Reproductive toxicity assessment of chronic dietary exposure to soy isoflavones in male rats. **Reprod Toxicol**, v. 18, n. 4, p. 605-11, 2004.

FAN, J. et al. Berry and Citrus Phenolic Compounds Inhibit Dipeptidyl Peptidase IV: Implications in Diabetes Management. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, Article ID 479505, p. 1-13, 2013.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. Disponível em: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>. Acesso em: 25/10/2014.

FOLADOR, P.; CAZAROLLI, L. H.; GAZOLA, A.C. Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 81, p. 1180-1187, 2010.

FOWLER, M. J. Diabetes Treatment, Part 2: Oral Agents for Glycemic Management. **Clinical Diabetes**, v. 25, n.3, p. 107-109, 2007.

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.

FU, Z. et al. Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 37, n. 3, p. 480-8, Jun 2012.

FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Curr Diabetes Rev**, v. 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

FU, Z.; LIU, D. Long-term exposure to genistein improves insulin secretory function of pancreatic β -cells. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 321-7, 2009.

GILBERT, E. R.; LIU, D. Anti-diabetic functions of soy isoflavone genistein: mechanisms underlying its effects on pancreatic beta-cell function. **Food Funct**, v. 4, n. 2, p. 200-12, 2013.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, n. 6, p. 597-605, 2006.

GOMES, M. B. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009. Disponível em: http://www.proac.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/diretrizes09_fi_nal_0.pdf. Acesso em: 15/10/2014.

HAMDEN, K. (Abstract) Therapeutic effects of soy isoflavones on α -amylase activity, insulin deficiency, liver–kidney function and metabolic disorders in diabetic rats. **Natural Product Research**, v. 25, n. 3, p. 244-55, 2011.

HAN, S. J. et al. Incretin secretion and serum DPP-IV activity in Korean patients with type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 89, n. 3, p. e49-52, 2010.

HENQUIN, J. C. et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. **Eur J Clin Invest**, v. 33, n. 9, p. 742-50, 2003.

HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, n. 11, p. 1751-60, 2000.

HERMAN, M. A.; KAHN, B. B. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. **J Clin Invest**, v.116, p.1767-75, 2006.

HOLST, J. J. The physiology of glucagon-like peptide 1. **Physiol Rev**, v. 87, n. 4, p. 1409-39, 2007.

HOLST, J. J.; VILSBOLL, T.; DEACON, C. F. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. **Mol Cell Endocrinol**, v. 297, n. 1-2, p. 127-36, 2009.

HUANG, X. F.; ARVAN, P. Intracellular transport of proinsulin in pancreatic beta-cells. Structural maturation probed by disulfide accessibility. **J Biol Chem**, v. 270, n. 35, p. 20417-23, 1995.

HUNG, H.; QIAN, K.; MORIS-NATSCHKE, S. L. et al. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. **Natural Product Report**, v. 29, n. 580, p. 580-606, 2012.

IMERYUZ, N. et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. **Am J Physiol**, v. 273, n. 4, p. G920-7, 1997.

INZUCCHI, S. E.; MCGUIRE, D. K. New Drugs for the Treatment of Diabetes. **Circulation**, v.117, p.574-584, 2008.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res**, v. 53, n. 2, p. 131-42, 2004.

JORGE, A.P.; HORST, H.; DE SOUSA, E.; PIZZOLATTI, M.G.; BARRETO SILVA, F.R.M.B. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on ¹⁴C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions**, v.2-3, n.79, p.89-96, 2004.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-6, 2006.

[KAKO, M.](#) et al. Effect of senegin-II on blood glucose in normal and NIDDM mice. **Biol Pharm Bull**, v. 18, n. 8, p. 1159-61, 1995.

KAKO, M. et al. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Polygala senega* in normal and diabetic mice and its main component, the

triterpenoid glycoside senegin-II. **Planta Med**, v. 62, n. 5, p. 440-3, 1996.

KAKO, M.; TOSHIHIRO, M.; NISHIYAMA, Y.; et al. Hypoglycemic Effect of the Rhizomes of *Polygala senega* in Normal and Diabetic Mice and its Main Component, the Triterpenoid Glycoside Senegin-II. **Planta Medica**, v. 62, n.5, p. 440-443, 1996.

KAPPEL, V. D.; PEREIRA, D. F.; CAZAROLLI, L. H. et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. **Molecules**, v. 17, p. 6754-6768, 2012.

KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2: a major pathway of intestinal sugar absorption. **Diabetes**, v. 54, n. 10, p. 3056-62, 2005.

KHALAF, R. A. et al. Design, Synthesis and Biological Evaluation of N4-Sulfonamido-Succinamic, Phthalamic, Acrylic and Benzoyl Acetic Acid Derivatives as Potential DPP IV Inhibitors. **Open Med Chem J**, v.7, p.39-48, 2013.

KHITKA, B. et al., Antioxidant properties of puerarin and genistein from White kwao krua induced by elicitors and they antihyperglycemic effect on rats. **Suranaree J. Sci. Technol**, v.17, p. 27-37, 2009.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, n. 1, p. 200-5, 2004.

KLEIN, L. C., JR.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL FILHO, V. A pharmacognostic approach to the *Polygala* genus: phytochemical and pharmacological aspects. **Chem Biodivers**, v. 9, n. 2, p. 181-209, 2012.

KO, K. P. Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 15, n. 17, p. 7001-10, 2014.

KOMATSU, M. et al. Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. **J Diabetes Investig**, v. 4, n. 6, p. 511-6, 2013.

KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochemistry (Mosc)**, v. 66, n. 3, p. 267-81, 2001.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal Biochem**, v. 4, p. 17-23, Jul 1962.

KWON, D. Y. et al. Isoflavonoids and peptides from meju, long-term fermented soybeans, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects in vitro. **Nutrition**, v. 27, n. 2, p. 244-52, 2011.

LEE, D. S.; LEE, S. H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor. **FEBS Lett**, v. 501, n. 1, p. 84-6, 2001.

LIM, G. E.; BRUBAKER, P. L. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. S70-77, 2006.

LIU, D. et al. Genistein Acutely Stimulates Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells Through a cAMP-Dependent Protein Kinase Pathway. **Diabetes**, 2006 v. 55, n.4, p.1043-50, 2006.

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

LÜDTKE, R. A família Polygalaceae na região sul do Brasil, Brasil. Tese de Doutorado, 2008, 7p.

MATTEUCCI, E; GIAMPIETRO, O. Dipeptidyl peptidase IV (CD26): Knowing the function before inhibiting the enzyme. **Curre. Med. Chem.** v.16, p. 2943-2951, 2009.

MALARDE, L. et al. A fermented soy permeate improves the skeletal muscle glucose level without restoring the glycogen content in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Med Food**, v. 16, n. 2, p. 176-9, 2013.

MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, n. 2, p. 223-41, 1996.

MELONI, A. R. et al. GLP-1 receptor activated insulin secretion from pancreatic beta-cells: mechanism and glucose dependence. **Diabetes Obes Metab**, v. 15, n. 1, p. 15-27, 2013.

MERCK. The Merck manual professional edition: Diabetes mellitus, 2014. Disponível em: http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine_and_metabolic_disorders/diabetes_mellitus_and_disorders_of_carbohydrate_metabolism/diabetes_mellitus_dm.html. Acesso em: 25/10/14.

MOHAMED, N. A.; SAWSAN, A.Z.; MOUSTAFA, Y. M. Effect of Sitagliptin in Combination with Glimepiride on Glycemic Control and Islet Cell Diameter/Proliferation in A Model of Type 2 Diabetic Rats. **IOSR Journal Of Pharmacy**, v. 3, n. 9, p. 72-80, 2013.

MORAN, J. et al. 17beta-Estradiol and genistein acute treatments improve some cerebral cortex homeostasis aspects deteriorated by aging in female rats. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 4, p. 414-21, 2013.

MUKESH, R.; NAMITA, P. Medicinal Plants with Antidiabetic Potential - A Review. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, v.13, n.1, p. 81-94, 2013.

MUNRO, I. C. et al. Soy isoflavones: a safety review. **Nutr Rev**, v. 61, n. 1, p. 1-33, 2003.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 193-205, 2008.

NADAL, A. et al. Role of estrogen receptors alpha, beta and GPER1/GPR30 in pancreatic beta-cells. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 16, p. 251-60, 2011.

NOVO NORDISK. The beta-cell in type 2 diabetes mellitus, 2009. Disponível em: <http://www.novonordisk.com/images/diabetes/hcp/GLP1/pdf/The-Beta-Cell.pdf>. Acesso em: 25/10/2014.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol**, v. 2, p. 411-29, 2014.

PAPWORTH, D. G.; PATRICK, G. The kinetics of influx of calcium and strontium into rat intestine in vitro. **J Physiol**, v. 210, n. 4, p. 999-1020, 1970.

PATEL, D. et al. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pac J Trop Biomed**, v.2, p.320-30, 2012.

PEDROSA, A. M. Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxauréia. 2013. 109p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

PEPPA, M.; VLASSARA, H. Advanced glycation end products and diabetic complications: a general overview. **Hormones (Athens)**, v. 4, n. 1, p. 28-37, 2005.

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

PHILLIPS, L. K.; PRINS, J. B. Update on incretin hormones. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1243, p. E55-74, 2011.

RAJAGOPAL, S.; FIELDS, B. L.; KAMATCHI, G. L. Contribution of protein kinase Calpha in the stimulation of insulin by the down-regulation of Cavbeta subunits. **Endocrine**, v. 47, n. 2, p. 463-71, 2014.

RANGANATH, L. R. The entero-insular axis: implications for human metabolism. **Clin Chem Lab Med**, v. 46, n. 1, p. 43-56, 2008.

RAZ, I. Guideline Approach to Therapy in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. **Diabetes care**, v. 36, n. 2, p. S139-44, 2013.

ROGERS, G. J. et al. Electrical activity-triggered glucagon-like peptide-1 secretion from primary murine L-cells. **J Physiol**, v. 589, n. 5, p. 1081-93, 2011.

ROPERO, A. B. et al. Role of ERbeta and GPR30 in the endocrine pancreas: A matter of estrogen dose. **Steroids**, v. 77, n. 10, p. 951-8, 2012.

RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 155-79, 2013.

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

SAMMAIAH, G. SRIVASTAVA, R. S. Hypoglycemic Activity of *Polygala erioptera* (Whole Plant) in Normal and Alloxan Induced Diabetic Rats. **Asian Journal of Chemistry**, v. 20, n.1, p. 107-112, 2008.

SCHEEN, A. J.; LEFEBVRE, P. J. Oral antidiabetic agents. A guide to selection. **Drugs**, v. 55, n. 2, p. 225-36, 1998.

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

SHARMA, S. D.; SIVAKAMI, S. Responses of intestinal and renal alpha-glycosidases to alloxan and streptozotocin-induced diabetes: a comparative study. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 4, p. 647-56, 1998.

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. E. Williams, D. B. (ed.). *Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways and Health Implications*. **NOVA SCIENCE PUBLISHERS**, v.1, p.1-44, 2013.

SILVA, F.R.M.B.; SZPOGANICZ, B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; DE SOUZA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.12, n. 83, p.33-37, 2002.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, n. 2, p. 129-46, 2001.

SORIANO, S. et al. Regulation of K(ATP) channel by 17beta-estradiol in pancreatic beta-cells. **Steroids**, v. 76, n. 9, p. 856-60, 2011.

SORIANO, S. et al. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17{beta}-estradiol in pancreatic {beta}-cells involves the estrogen receptor {beta} and the atrial natriuretic peptide receptor. **Mol Endocrinol**, v. 23, n. 12, p. 1973-82, 2009.

STEINER, D. F.; CHAN, S. J. C.; RUBENSTEIN, A. H. Biosynthesis of Insulin. **Comprehensive Physiology**, v. 21, p. 49-78, 2011.

STEINER, D.; OYER, P. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. **Natl Acad Sci USA**, v. 57 p. 473-480, 1967.

TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85-96, 2006.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.298, p.E141-5, 2010.

TOLHURST, G.; REIMANN, F.; GRIBBLE, F. M. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. **J Physiol**, v. 587, n.1, p. 27-32, 2009.

VENZKE, D. et al. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (polygalaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 12, p. 1991-1997, 2013.

VILSBOLL, T.; HOLST, J. J. Incretins, insulin secretion and Type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 47, n. 3, p. 357-66, 2004.

WAGET, A. et al. Physiological and pharmacological mechanisms through which the DPP-4 inhibitor sitagliptin regulates glycemia in mice. **Endocrinology**, v. 152, n. 8, p. 3018-29, 2011.

WANG, Q. et al. Soy isoflavone: The multipurpose phytochemical (Review). **Biomed Rep**, v. 1, n. 5, p. 697-701, 2013.

WEIR, G. C. ; LAYBUTT, D. R.; KANETO, H.; BONNER-WEIR, S.; SHARMA, A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, v. 50, p. S154-S159, 2001.

WITKOWSKA, D. et al. The effect of zinc and magnesium on calcium uptake into the rat duodenum slices. **Biol Met**, v. 2, n. 1, p. 36-9, 1989.

YANG, S. N.; BERGGREN, P. O. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology. **Endocr Rev**, v. 27, n. 6, p. 621-76, 2006.

YI, P.; PARK, J. S.; MELTON, D. A. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 747-58, 2013.

ZANATTA, L.; De SOUSA, E.; CAZAROLLI, L.H. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 151-155, 2007.