

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

BÁRBARA GRAZIELA POSTAL

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO E DE VIAS DE  
SINALIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES EM *Ilex*  
*paraguariensis* St. Hil. ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASIA DA  
GLICOSE**

Florianópolis  
2015

BÁRBARA GRAZIELA POSTAL

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO E DE VIAS DE  
SINALIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES EM *Ilex*  
*paraguariensis* St. Hil. ENVOLVIDAS NA HOMEOSTASIA DA  
GLICOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fátima Regina Mena Barreto Silva.

Florianópolis  
2015

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

Postal, Bárbara Graziela  
Caracterização do Efeito e de Vias de Sinalização de Compostos Presentes em *Ilex paraguariensis* St. Hil. Envolvidas na Homeostasia da Glicose / Bárbara Graziela Postal ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva - Florianópolis, SC, 2015.  
140 p.

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

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Homeostasia da glicose. 4. Diabetes. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

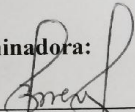
**“Caracterização do efeito e de vias de sinalização de compostos presentes em Ilex paraguariensis St. Hil. Envolvidas na homeostasia da glicose”**

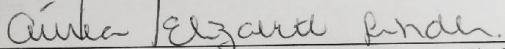
**POR**

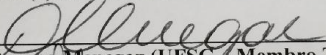
**Bárbara Graziela Postal**

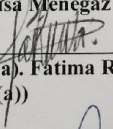
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

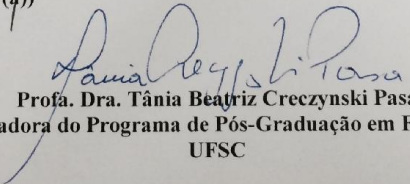
**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Beatriz Garcia Mendes Borba (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Aurea Elizabeth Linder (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Dr(a). Danusa Menegaz (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Fatima Regina Mena Barreto Silva (UFSC – Orientador(a))

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

Florianópolis, 07 de agosto de 2015.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Fátima Regina Mena Barreto Silva por toda ajuda, paciência, incentivo, oportunidade, confiança e orientação durante o período de 5 anos no Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais, da iniciação científica ao mestrado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais pelas ótimas discussões e trocas de experiências científicas, por nunca negarem ajuda, sempre me apoiarem e por serem uma equipe de trabalho unida e maravilhosa que proporcionaram momentos únicos. 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 Camila Pires Mendes, pela ajuda, parceria e apoio em todos os experimentos e momentos da realização deste trabalho. Obrigada pela amizade, carinho e incentivo em muitos momentos, dentro ou fora do laboratório, tudo ficou mais fácil com tua companhia.

Às doutoras Virginia Demarchi Kappel, Danielle Fontana Pereira e Luisa Helena Cazarolli por toda paciência, ajuda, atenção e ensinamentos, cresci muito cientificamente, graças à vocês.

Agradeço também às alunas de iniciação científica Ana Luiza Ludwig Moraes e Mayara Brich, sempre dedicadas e comprometidas, que contribuíram grandemente para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e parceria em todos os momentos, sejam dentro ou fora do laboratório.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto e ao doutorando Carlos Henrique Blum da Silva por terem sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda.

Meu especial agradecimento a minha família, por apoiar todas as minhas escolhas e decisões, por torcerem pelo meu sucesso e por me amarem e apoiarem sempre incondicionalmente. Aos meus pais Sônia e Valdecir, pelo exemplo, educação, incentivo, palavras de apoio e por me ensinarem a sempre lutar e buscar a realização dos meus sonhos. Aos meus irmãos, por sempre torcerem pela realização dos meus objetivos, pelo carinho e parceria em todos os momentos. Vocês são os meus orgulhos Henrique e Luiz Gabriel Postal.

Agradeço aos amigos de sempre, pelas palavras de apoio, pelas boas risadas e pela companhia, principalmente à Carolina Eto, por sempre me ajudar, ouvir e compartilhar minhas frustrações, sempre com um ombro amigo e conselhos tranquilizantes em todos os momentos.

Aos Professores componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia e demais PPGs que contribuíram para minha formação.

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.

À Deus por me iluminar e pela força inexplicável.

*“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas que importa? Nós temos que ter perseverança e acima de tudo confiança em nós mesmos. Temos de acreditar que somos dotados de algo e que esta coisa deve ser atingida.”*

(Marie Skłodowska-Curie)





## RESUMO

A manutenção das concentrações homeostáticas de glicose no sangue é essencial para o bem-estar de todo o organismo. Após efetiva absorção intestinal de glicose, as células  $\beta$  pancreáticas secretam insulina em resposta às concentrações glicêmicas elevadas para o controle da sua captação, utilização e armazenamento dos nutrientes celulares. Defeitos na ação e/ou na secreção de insulina podem levar à hiperglicemia, característica da diabetes melito. A diabetes melito é uma patologia complexa e multifatorial de elevada morbidade e mortalidade e, por esse motivo, é considerada uma epidemia, caracterizando um problema de saúde pública mundial. Muitas plantas são conhecidas na medicina popular de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes e tem um uso crescente no tratamento da diabetes. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o efeito de alguns compostos naturais selecionados na absorção intestinal de glicose, assim como caracterizar o efeito e as vias de sinalização da teobromina e do ácido cafeico na homeostasia da glicose. Tanto a teobromina quanto o ácido cafeico foram avaliados quanto às atividades antihiperglicêmica e/ou hipoglicemiante na curva de tolerância à glicose, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular, a inibição das enzimas  $\alpha$ -glicosidases e a propriedade anti-glicação. Além disso, foram avaliados a atividade anti lipidêmica e o mecanismo de ação da teobromina na captação de glicose em músculo sóleo, assim como o efeito em ratos resistentes à insulina e o mecanismo de ação do ácido cafeico na captação de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar machos entre 50-55 dias de idade. Para os estudos *in situ*, o intestino foi exposto e dividido em 4 segmentos, nos quais foram adicionados solução de glicose, florizina, inibidor do transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1), e/ou o composto a ser testado e, após 30 min, a concentração de glicose foi medida em cada segmento. Para a realização da curva de tolerância à glicose as coletas de sangue, para determinação da glicose e insulina sérica, foram realizadas nos tempos zero, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos após uma sobrecarga de glicose de 4mg/kg. Nos ensaios para a determinação do conteúdo de glicogênio os tecidos foram retirados dos animais 3 h após os tratamentos. As atividades das dissacaridases intestinais e a propriedade anti-glicação foram realizadas *in vitro*. A captação de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi estudada após a incubação do músculo sóleo com a teobromina, na presença ou ausência de inibidores. A avaliação do efeito da teobromina em ratos resistentes à insulina foi realizada *in vivo*, em um tratamento de 5 dias. As ilhotas pancreáticas foram isoladas e incubadas com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  e ácido cafeico, na presença ou

não de diferentes inibidores e ativadores de canais e vias de sinalização intracelular. Entre as substâncias testadas, miricitrina, quercetina, catequina, naringenina, ácido cafeico, rutina e fukugetina reduziram significativamente a captação de glicose via o transportador SGLT1, atividade avaliada na presença de florizina. Além disso, tanto a teobromina, quanto o ácido cafeico reduziram significativamente a glicemia de ratos normais em estado hiperglicêmico. Adicionalmente, observou-se um aumento no conteúdo de glicogênio no músculo sóleo e fígado após o tratamento com teobromina. O ácido cafeico reduziu a atividade da maltase e sacarase e, assim como a teobromina, preveniu a glicação. A teobromina estimulou a captação de glicose no músculo sóleo através de uma via de sinalização semelhante à da insulina, principalmente, estimulando a translocação e síntese proteica do GLUT4. O ácido cafeico estimulou a captação de cálcio em ilhotas pancreáticas isoladas, atuando como um potencial agente secretagogo de insulina. Desta forma, apoiado nos resultados obtidos neste trabalho, propõe-se que alguns compostos naturais como a miricitrina, quercetina, catequina, naringenina, rutina e fukugetina, presentes em muitas plantas, regulem a absorção de glicose, atuando em um alvo intestinal, o SGLT1. Além disso, a teobromina e o ácido cafeico, aqui estudados, podem regular a homeostasia da glicose. Os mecanismos pelo qual a teobromina atua envolvem a utilização de glicose pelos tecidos periféricos, assim como melhora no estado de resistência à insulina e a inibição da glicação de proteínas. Enquanto que os mecanismos do ácido cafeico parecem envolver a inibição da absorção intestinal da glicose, o estímulo da secreção de insulina e a inibição da glicação. Estes resultados sugerem que estes dois compostos podem ser responsáveis por muitos dos múltiplos mecanismos de ação de *Ilex paraguariensis* (IP) para regular a homeostasia da glicose e contribuir para a prevenção das complicações da diabetes.

**Palavras-chave:** homeostasia glicêmica; diabetes; hiperglicemia; teobromina; ácido cafeico; *Ilex paraguariensis*; flavonóides; síntese de glicogênio; secreção insulina; produtos finais de glicação avançada (AGEs); dissacaridasas; captação de glicose; captação de cálcio; ilhotas pancreáticas.

## ABSTRACT

Effect and signaling pathways of compounds present in the *Ilex paraguariensis* St. Hill. involved in glucose homeostasis

The maintenance of the homeostatic blood glucose concentrations is crucial to the well-being of the whole organism. After Effective intestinal absorption of glucose, the pancreatic  $\beta$  cells secrete insulin in response to elevated glucose concentrations for controlling the uptake, use and storage of cellular nutrients. Defects in action and/or secretion of insulin may lead to hyperglycemia, which characterizes diabetes mellitus. Diabetes mellitus is a complex and multifactorial disease with high morbidity and mortality, therefore is considered epidemic causing a public health problem worldwide. Many plants are known in folk medicine of different cultures for their hypoglycemic properties and show an increasing use in the treatment of diabetes. Therefore, the aim of this study was to characterize the effect of some selected natural compounds in the intestinal absorption of glucose, as well as to characterize the effect and signaling pathways of theobromine and caffeic acid in glucose homeostasis. Theobromine and caffeic acid were evaluated for antihyperglycemic and /or hypoglycemic activities in the curve of glucose tolerance, the hepatic glycogen content and muscle, inhibition of the enzymes  $\alpha$ -glucosidases and anti-glycation property. In addition, was studied the antilipidemic activity and the mechanism of action of theobromine in glucose uptake in soleus muscle, as well as the effect on insulin resistant rats and the mechanism of action of caffeic acid on calcium uptake in rat isolated pancreatic islets. Wistar male rats with 50-55 days of age were used. For the *in situ* studies, the intestine was exposed and divided into four segments, which each segment was uploaded with glucose solution, phlorizin and/or compounds and, after 30 min, the glucose concentration was measured into the respective intestinal segment. To glycemia determination, the blood samples were collected at zero, 15, 30, 60, 120 and 180 min in glucose tolerance curve. Tissues were removed from animals 3 h after oral administration of treatments to determine glycogen content. The intestinal disaccharidases activities and anti-glycation property were performed *in vitro*. The glucose uptake was studied after incubation of the soleus muscle with theobromine, in the presence or not of different inhibitors and of  $^{14}\text{C}$ -glucose. The evaluation of the effect of theobromine in insulin resistant rats was performed *in vivo* on a treatment of 5 days. The pancreatic islets were isolated and incubated with  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  and caffeic acid in the presence or absence of various inhibitors or activators. Among the substances assayed, myricitrin, quercetin, catechin, naringenin, caffeic acid, rutin and fukugetin

significantly reduced the glucose uptake by affecting the SGLT1 transporter activity measured in the presence of phlorizin. Furthermore, both theobromine, as caffeic acid significantly reduced plasma glucose in normal rats hyperglycemic state and caffeic acid stimulated insulin secretion. Additionally, it was observed an increase on glycogen content in muscle and liver after treatment with theobromine. The caffeic acid reduced the activity of maltase and sucrase and, like theobromine, prevented glycation. Theobromine stimulated glucose uptake in soleus muscle via signaling pathway similar to that of insulin, mainly by stimulating protein synthesis and translocation of GLUT4. The caffeic acid stimulated calcium uptake in isolated pancreatic islets, as a potential insulin secretagogue agent. Thus, supported by the results of this study, it is proposed that some natural compounds like myricitrin, quercetin, catechin, naringenin, caffeic acid, rutin and fukugetin are able to regulate glucose absorption by acting in an intestinal target, SGLT1. Moreover, theobromine and caffeic acid are able to regulate glucose homeostasis. The mechanisms by which theobromine acts involving the use of glucose by peripheral tissues, and improvement in insulin resistant state and the inhibition of protein glycation. While the mechanisms of caffeic acid involve the inhibition of intestinal absorption of glucose, stimulation of insulin secretion and inhibition of glycation. These results suggest that these two compounds may be responsible for many of the multiple *Ilex paraguariensis* (IP) mechanisms of action to regulate glucose homeostasis and contribute to the prevention of complications of diabetes.

**Key words:** homeostasis glycemic; diabetes; hyperglycemia; theobromine; caffeic acid, *Ilex paraguariensis*; flavonoids; glycogen synthesis; insulin secretion; AGEs; disaccharidases; glucose uptake; calcium uptake; pancreatic islets.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transporte e monossacarídeos pelos enterócitos. ....	26
Figura 2 - Etapas da síntese da insulina. ....	28
Figura 3 - Fases de liberação da insulina.....	30
Figura 4 - Mecanismo de secreção de insulina pelas células $\beta$ -pancreáticas.....	32
Figura 5 - Sinalização periférica da insulina. ....	35
Figura 6 - Síntese de glicogênio.....	37
Figura 7 - Formação dos Produtos Finais de Glicação (AGEs). ....	41
Figura 8 - <i>Ilex paraguariensis</i> St. Hil.var. <i>paraguariensis</i> . ....	45
Figura 9 - Curva de tempo na absorção intestinal de glicose.....	60
Figura 10 - Efeito da florizina na absorção intestinal de glicose.....	61
Figura 11 - Efeito do ácido cafeico na absorção intestinal de glicose... 61	
Figura 12 - Efeito da catequina na absorção intestinal de glicose.....	62
Figura 13 - Efeito da miricitrina na absorção intestinal de glicose. ....	63
Figura 14 - Efeito da quercetina na absorção intestinal de glicose.....	64
Figura 15 - Efeito da naringenina na absorção intestinal de glicose. ....	65
Figura 16 - Efeito da rutina, fukugetina, hispidulina e ácido clorogênico na absorção intestinal de glicose. ....	66
Figura 17 - Efeito agudo do ácido cafeico na curva de tolerância a glicose. ....	67
Figura 18 - Efeito do ácido cafeico na atividade de dissacaridases intestinais maltase (figura 18 A) sacarase (figura 18 B) e lactase (figura 18 C).....	68
Figura 19 - Curva de concentração-resposta (A) e de tempo (B) do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ nas ilhotas pancreáticas.....	70
Figura 20 - Modulação do ácido cafeico nos canais de potássio dependentes de ATP em ilhotas pancreáticas.....	72
Figura 21 - Envolvimento do ácido cafeico nos canais de cálcio dependentes de voltagem em ilhotas pancreáticas. ....	73
Figura 22 - Envolvimento da mobilização do cálcio intracelular em ilhotas pancreáticas, no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	75
Figura 23 - Influência das proteínas cinases A e C no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	76
Figura 24 - Efeito agudo do ácido cafeico no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	77
Figura 25 - Efeito do ácido cafeico na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	78
Figura 26 - Efeito do ácido cafeico na atividade da LDH sérica.....	79

Figura 27 - Efeito agudo da teobromina na curva de tolerância a glicose. .....	80
Figura 28 - Efeito da teobromina na concentração sérica de triglicérides. .....	80
Figura 29 - Efeito agudo da teobromina no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	81
Figura 30 - Efeito da teobromina na atividade de dissacaridases intestinais maltase (figura 31 A) sacarase (figura 31 B) e lactase (figura 31 C)...	82
Figura 31 - Efeito da teobromina na captação <i>in vitro</i> de 14C-deoxi- glicose no músculo sóleo. ....	83
Figura 32 - Efeito da teobromina na captação <i>in vitro</i> de 14C-deoxi- glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica. ....	84
Figura 33 - Efeito da teobromina na captação <i>in vitro</i> de 14C-deoxi- glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica. ....	86
Figura 34 - Efeito da teobromina na captação <i>in vitro</i> de 14C-deoxi- glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica. ....	87
Figura 35 - Efeito da teobromina no conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo. ....	88
Figura 36 - Efeito da teobromina na expressão de mRNA de GLUT4. ....	89
Figura 37 - Efeito da teobromina em modelo animal de resistência à insulina, induzida por dexametasona. ....	90
Figura 38 - Efeito da teobromina na concentração plasmática de lipídios e na atividade da enzima LDH em ratos resistentes e não resistentes... ..	91
Figura 39 - Efeito da teobromina na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose. ....	92
Figura 40 - Efeito da teobromina na atividade da LDH sérica.....	93
Figura 41 - Inibição da absorção intestinal de glicose via SGLT1. ....	111
Figura 42 - Mecanismo de ação do ácido cafeico na homeostasia da glicose. ....	112
Figura 43 - Mecanismo de ação da teobromina na homeostasia da glicose. .....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS

$^{14}\text{C-DG}$	[U- $^{14}\text{C}$ ]-2-deoxi-D-glicose
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
ADP	Adenosina bifosfato
AGE	Produto final de glicação avançada
AMP-cíclico	Adenosina monofosfato cíclico
AS160	Proteína substrato da Akt de 160 kDa
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina bovina
$\text{Ca}^{2+}$	Íon cálcio
Cav	Canais de cálcio sensíveis à voltagem
CEUA	Comissão de ética no Uso de animais
DAG	Diacilglicerol
DM	Diabetes melito
DPP-IV	Dipeptidilpeptidase IV
eEF2K	Cinase eucariótica do fator 2 do alongamento
ERK	Cinase reguladora de sinal extracelular
G-6-P	Glicose-6-fosfato
G-1-P	Glicose-1-fosfato
GAP	Proteína ativadora de GTPases
GDP	Guanosina bifosfato
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT	Transportador de glicose
GS	Glicogênio sintase
GSK-3	Glicogênio Sintase cinase 3
GSVs	Vesículas contendo GLUT4
GTP	Guanosina trifosfato



H-89	N-[2-(p-bromocianamilamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-c	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HEPES	Ácido etanosufônico 2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-yl]
HMIT	Transportador de H <sup>+</sup> ligado ao mio inositol
IDF	Federação Internacional de Diabetes
<i>IP</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>
IRS	Substrato receptor de insulina
K <sup>+</sup>	Íon potássio
K <sup>+</sup> <sub>ATP</sub>	Canal de potássio dependentes de ATP
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis
KRb	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato
KRb-HEPES	Tampão Krebs Ringer-bicarbonato adicionado de HEPES
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-c	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEK	Proteína tirosina/treonina cinase
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
ηM	Nanomolar
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDK	Proteína cinase dependente de 3-fosfoinositídeos

PI3K	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA	Proteína cinase A
PKB/ Akt	Proteína cinase B
PKC	Proteína cinase C
$\rho$ M	Picomolar
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
Ras	Proteína GTPase
Raf	Proteína serina/treonina cinase
RAGE	Receptor específico de AGE
rpm	Rotação por minuto
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	Bomba $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático
SGLT-1	Proteína co-transportadora de $\text{Na}^+$ /glicose 1
SLC5A	Família dos transportadores de glicose dependentes de sódio
SNARE	Receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-etilmaleimida
SUR	Receptor de sulfoniureia
UDP-G	Uridinadifosfato glicose
VDCC-L	Canal de $\text{Ca}^{2+}$ dependentes de voltagem do tipo L
VDDC-T	Canais de $\text{Ca}^{2+}$ dependentes de voltagem tipo T
VLDL	Lipoproteína de densidade intermediária
VLDL-c	Colesterol da lipoproteína de densidade intermediária
Vmax	Velocidade máxima
$\mu\text{Ci}$	Micro Curie

$\mu\text{M}$

Micro molar

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
1.1 Homeostasia da glicose .....	23
1.1.1 Absorção de glicose .....	23
1.1.2 Insulina: histórico, síntese, secreção e vias de sinalização.....	26
1.1.2.1 Histórico	26
1.1.2.2 Síntese de Insulina	27
1.1.2.3 Secreção de insulina	29
1.1.3 Captação de glicose nos tecidos periféricos .....	32
1.2.3 Síntese de glicogênio.....	36
1.2 Diabetes Melito .....	38
1.2.1 Aspectos gerais.....	38
1.2.2 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) e as complicações da Diabetes .....	40
1.2.3 Tratamento da diabetes.....	42
1.3 Plantas medicinais e compostos naturais.....	43
1.3.1 Plantas medicinais como alvos terapêuticos da diabetes.....	43
1.3.2 <i>Ilex paraguariensis</i> .....	44
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>47</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
3.1 Objetivo Geral.....	49
3.2 Objetivos específicos: .....	49
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>51</b>
4.1 Material .....	51
4.2 Obtenção e solubilidade dos compostos.....	51
4.3 Animais .....	51
4.4 Determinação da curva de tolerância à glicose .....	52
4.5 Teste de tolerância à emulsão lipídica e concentração de triglicerídeos plasmáticos .....	52

4.6	Determinação da atividade das dissacaridases intestinais <i>in vitro</i> ..	53
4.7	Atividade do co-transportador de glicose sódio-dependente. ....	53
4.8	Isolamento das ilhotas pancreáticas .....	53
4.9	Influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas isoladas de ratos.....	54
4.10	Determinação do conteúdo de glicogênio .....	54
4.11	Captação de $^{14}\text{C}$ -glicose em músculo sóleo de ratos.....	55
4.12	Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise de imunotransferência.....	55
4.13	PCR em tempo real .....	56
4.14	Indução de resistência à insulina com dexametasona .....	56
4.15	Determinação da atividade anti-glicação .....	57
4.16	Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) sérica .....	57
4.17	Análises estatísticas.....	57
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
5.1	Resultados Parte 1 – Efeito de compostos selecionados na homeostasia da glicose.....	59
5.1.1	Efeito de compostos naturais isolados na absorção intestinal de glicose através de um ensaio <i>in situ</i> .....	59
5.2	Resultados Parte 2 – Ação secretagoga de insulina do ácido cafeico.....	66
5.2.1	Efeito do ácido cafeico na curva de tolerância à glicose e na atividade das dissacaridases intestinais.....	66
5.2.2	Envolvimento do ácido cafeico no influxo de cálcio ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) em ilhotas pancreáticas .....	68
5.2.3	Investigação da modulação do ácido cafeico em canais de potássio dependentes de ATP ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ) em ilhotas pancreáticas. ....	70

5.2.4 Investigação do envolvimento da modulação de canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC-L e VDCC-T) em ilhotas pancreáticas no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .....	73
5.2.5 Estudo do envolvimento da mobilização do cálcio intracelular em ilhotas pancreáticas, no efeito estimulatório do ácido cafeico no aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . .....	74
5.2.6 Influência das proteínas cinases A e C no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.....	75
5.2.7 Efeito do ácido cafeico no conteúdo total de glicogênio hepático e muscular. ....	76
5.2.8 Efeito do ácido cafeico na formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs). ....	77
5.2.9 Efeito do ácido cafeico na atividade da LDH sérica. ....	79
5.3 Resultados Parte 3 – Efeito insulínomimético da teobromina no músculo sóleo.....	79
5.3.1 Efeito da teobromina na curva de tolerância à glicose, na atividade das dissacaridases intestinais e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular. ....	79
5.3.2 Efeito da teobromina no teste de tolerância à emulsão lipídica....	80
5.3.3 Efeito da teobromina na atividade das dissacaridases intestinais e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	81
5.3.4 Efeito da teobromina na captação de glicose no músculo sóleo...	82
5.3.5 Investigação do mecanismo da teobromina na translocação e fusão do GLUT4 no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica.....	83

5.3.6	Investigação do efeito da teobromina na transcrição gênica e síntese de proteínas no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica.....	85
5.3.7	Investigação do efeito da teobromina na ativação do GLUT4 no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica .....	87
5.3.8	Efeito da teobromina no conteúdo total de GLUT4.....	88
5.3.9	Efeito da teobromina na expressão de mRNA de GLUT4.....	89
5.3.10	Efeito da teobromina em modelo animal de resistência à insulina, induzida por dexametasona.....	89
5.3.2	Efeito da teobromina na formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).....	91
5.3.11	Efeito da teobromina na atividade da LDH sérica.....	92
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Homeostasia da glicose

#### 1.1.1 Absorção de glicose

A manutenção das concentrações homeostáticas de glicose no sangue é essencial para o bem-estar de todo o organismo. O metabolismo e homeostase glicêmica são regulados por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos e a insulina e o glucagon, hormônios secretados pelo pâncreas, são os principais reguladores fisiológicos desse equilíbrio. Além do pâncreas, o intestino, o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo desempenham um papel importante na manutenção energética (DROZDOWSKI & THOMSON, 2006; BERTRAND; VALET; CASTAN-LAURELL, 2015).

Um dos principais componentes da dieta, os carboidratos, por serem uma significativa fonte de glicose, desempenham um papel importante na homeostasia energética. A principal forma pela qual eles são ingeridos é a de polissacarídeos, porém, ainda é necessária a ação de enzimas salivares e digestivas para reduzir estes polissacarídeos em unidades mais simples, como os dissacarídeos. No entanto, os dissacarídeos ainda precisam ser hidrolisados pelas dissacaridases intestinais a monossacarídeos para serem transportados por transportadores específicos presentes na membrana dos enterócitos, células que formam o epitélio intestinal, do lúmen intestinal para a circulação sanguínea (LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012; SHARMA; SIVAKAMI, 1998; DROZDOWSKI & THOMSON, 2006; BERTRAND; VALET; CASTAN-LAURELL, 2015).

As dissacaridases, também conhecidas como glicosidades, são divididas em duas classes, as  $\alpha$  e  $\beta$  glicosidases. As  $\alpha$ -glicosidases hidrolisam a ligação  $\alpha$ -glicosídica dos dissacarídeos conectados por ligações do tipo  $\alpha$ . As principais representantes desta classe são as enzimas amilases, trealose-6-fosfato hidrolase, sacarase e maltase. Dentre elas, a maltase e a sacarase, são as mais estudadas como possíveis alvos terapêuticos da diabetes, por hidrolisar, respectivamente, a maltose, liberando duas unidades de glicose, e a sacarose, liberando frutose e glicose podendo, dessa forma, serem absorvidas pelos enterócitos (LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012 ; KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

Quanto às  $\beta$ -glicosidases, as principais representantes são as  $\beta$  glicosidase,  $\beta$ -galactosidase ou lactase,  $\beta$ -glicuronidase, e  $\beta$ -D-acetil-hexosaminidase. As  $\beta$ -glicosidases atuam em sacarídeos com ligação  $\beta$ -glicosídica. A lactase, por exemplo, hidrolisa a ligação  $\beta$  da lactose,



liberando unidades de glicose e galactose (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001).

Existe disponível no mercado um medicamento conhecido como acarbose que atua como um adjuvante no tratamento da diabetes, pois ele inibe as enzimas maltase e sacarase impedindo assim a quebra dos dissacarídeos e consequente transporte da glicose para a circulação sanguínea. Por esta ação se restringir as  $\alpha$ -glicosidades, torna esta terapia de interesse, pois não induz uma intolerância à lactose no paciente, por não inibir a lactase (KRASIKOV; KARELOV; FIRSOV, 2001; GOMIS, 2008).

Após a liberação dos monossacarídeos, eles serão transportados para o interior da célula. A forma como a glicose é internalizada varia de acordo com a concentração presente no lúmen intestinal. No estado alimentado concentrações elevadas de glicose são atingidas no lúmen intestinal (50-300 mM). Neste momento a absorção de glicose ocorre através de um sistema combinado em que primeiramente atua o SGLT1 (transportador de glicose dependente de sódio, do inglês sodium-glucose linked transporter, tipo 1) pertencente à família SLC5A (solute carrier family 5 sodium/glucose cotransporter, member 1). No entanto, devido ao baixo  $V_{max}$  que o SGLT1 apresenta, ele é rapidamente saturável, e a absorção mediada pelo SGLT1 promove um sinal intracelular que resulta na translocação de vesículas contendo transportadores de difusão facilitada para a membrana do enterócito, bem como aumento da atividade intrínseca destes transportadores existentes na membrana. Estes transportadores pertencem a uma grande família, conhecida como GLUTs (transportadores de glicose, do inglês glucose transporters), responsáveis pela absorção de glicose em diversos tecidos. No enterócito, a absorção facilitada de glicose é mediada por GLUT2. O GLUT2 apresenta baixa afinidade ( $K_m$  para a glicose  $>50$  mM) e alta capacidade de transporte de glicose e, além dela, transporta também a frutose, galactose e manose. Estas características permitem o transporte eficiente de glicose após uma refeição, por exemplo, quando as concentrações da mesma se elevam, tornando o GLUT2 responsável por 75% da absorção da glicose pós-prandial (Figura 1) (LETURQUE, BROT-LAROCHE, LE GALL, 2012; SANTER et al., 2003; KELLETT & BROT-LAROCHE, 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009; SILVA et al., 2013; DROZDOWSKI; THOMSON, 2006; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009).

No entanto, antes de uma refeição, quando há menor presença de glicose no lúmen, o GLUT2 está suprimido na membrana apical, desempenhando apenas o papel na membrana basolateral através do transporte de glicose do enterócito para a corrente sanguínea. Nesse

momento está operando na membrana apical somente o SGLT1. Este transportador possui uma alta afinidade por glicose ( $K_m = 0,1 - 0,6$  mM), porém baixa capacidade de transporte (atividade para elevadas concentrações de substrato ou  $V_{max}$ ), o que permite a manutenção da glicemia em baixas concentrações de glicose. Porém, esta atividade é inibida pela florizina (um inibidor competitivo do SGLT1 com uma constante de inibição ou  $K_i = 0,1$  mM, ou seja, alta inibição) (KELLETT et al., 2008; HEDIGER et al., 1987; TURK et al., 1994; SANTER et al., 2003; KELLETT & BROT-LAROCHE, 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009; SILVA et al., 2013; LETURQUE; BROT-LAROCHE; LE GALL, 2009).

O SGLT1 possui uma região de ligação para sódio que induz uma alteração conformacional no transportador, tornando-o acessível à glicose, que é transportada ativamente contra um gradiente de concentração. Sendo assim, são necessárias duas moléculas de sódio, para cada molécula de glicose transportada, transportados na mesma direção, cujo gradiente transmembranar é gerado pela  $Na^+/K^+$  ATPase localizada na membrana basolateral (Figura 1) (SANTER et al., 2003; KELLETT & BROT-LAROCHE, 2005; ARAÚJO; MARTEL, 2009; SILVA et al., 2013; WRIGHT et al., 2003).

Os transportadores do tipo SGLT são muito estudados atualmente, fato reforçado pelos recentes estudos e lançamento no mercado dos inibidores de SGLT2, transportador responsável pela reabsorção de glicose nos rins (MIKHAIL, 2015; POWELL et al., 2015; VIVIAN, 2015). Porém, o inibidor do transportador SGLT1, a florizina, já é bem conhecida e estudada por atuar na inibição da absorção intestinal de glicose (MANOME & KURIAKI, 1961). Sendo assim, o sistema gastrointestinal exerce um importante papel na regulação da glicemia, principalmente, devido a absorção e distribuição de glicose para os demais tecidos. Portanto, a inibição deste transportador é um importante alvo de estudo para a descoberta de novas terapias anti-diabéticas.

Figura 1 - Transporte e monossacarídeos pelos enterócitos.

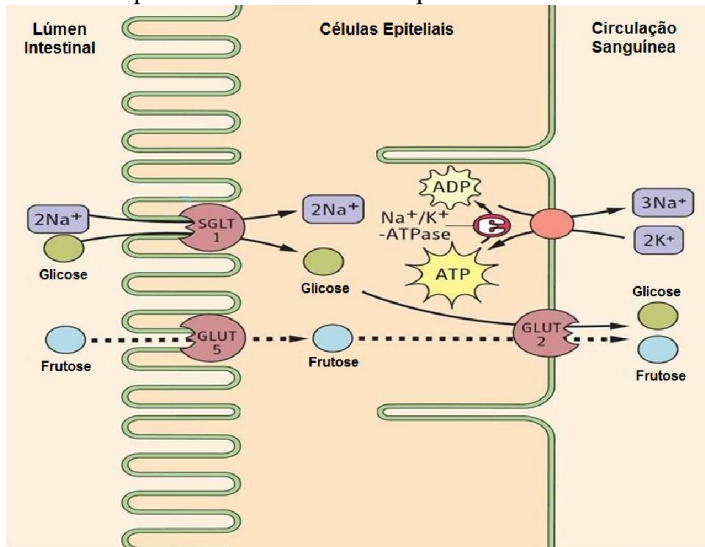


Figura 1 – Ação dos transportadores intestinais no transporte de monossacarídeos do lúmen intestinal para a circulação sanguínea. Após os dissacarídeos serem hidrolisados em monossacarídeos, esses são transportados por transportadores específicos, para dentro do enterócito e, após, transportados para a circulação sanguínea (adaptado de BAYNES & DOMINICZAK: Medical Biochemistry. 2 ed., 2004).

## 1.1.2 Insulina: histórico, síntese, secreção e vias de sinalização

### 1.1.2.1 Histórico

Após uma refeição e uma efetiva absorção intestinal de glicose, as células  $\beta$  pancreáticas secretam insulina em resposta a concentrações glicêmicas elevadas (cerca de 7 mmol/L ou 126 mg/dL), que, em um indivíduo saudável, suprime a produção de glicose hepática (gliconeogênese) e estimula a captação de glicose nos tecidos que respondem à insulina, músculo esquelético e tecido adiposo (GRUSOVIN, 2003; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011)

O pâncreas endócrino é uma glândula composta por quatro principais tipos de células distribuídas por toda a porção exócrina. Essas células estão agregadas em estruturas denominadas ilhotas de Langerhans, ou ilhotas pancreáticas (KULKARNI, 2004). Em roedores, cada ilhota é composta por 2.000 a 4.000 células, das quais 5% são células  $\delta$ , produtoras de somatostatina, 15 a 20% são células  $\alpha$  produtoras de

glucagon e 70 a 80% são células  $\beta$ , produtoras de insulina, ou seja, as células  $\beta$  são predominantes e estão agrupadas no núcleo da ilhota, cercado pelas células  $\alpha$ ,  $\delta$ , e PP. Assim, existe uma clara separação dos tipos celulares em diferentes regiões, sugerindo que existem subdivisões anatômicas na ilhota de roedores. Com relação a composição celular das ilhotas em humanos, estudos quantitativos detalhadas são escassos. Alguns estudos relataram que as ilhotas são compostos de 70% de células  $\beta$ , 20% de células  $\alpha$ , 10% de células  $\delta$ , e 5% de células PP. No entanto, estudos recentes tem proporcionado números mais baixos de células  $\beta$  e números mais elevados de células  $\alpha$ . Quanto à distribuição das células dentro da ilhota humana, não há estudos relatados na literatura, no entanto existem trabalhos relatando que ilhotas de humanos ou de macacos não tem a organização vista em roedores. Além disso, estima-se que humanos adultos tenham aproximadamente 2 milhões de ilhotas (2% do peso do pâncreas (ORCI, 1985, CABRERA, 2006).

A insulina foi uma das descobertas mais relevantes da medicina, agraciando Frederick Banting e John Mcleod com um dos mais rápidos prêmios Nobel em 1923. A estrutura da insulina foi primeiramente descrita em 1921, 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).

#### 1.1.2.2 Síntese de Insulina

A insulina é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso das células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas. 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). 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. Sequentemente 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 (Figura 2) (STEINER; OYER, 1967; FU; GILBERT; LIU, 2013).

O processo final de maturação da insulina é iniciado através da condução da pró-insulina ao complexo de Golgi. Dentro de vesículas imaturas, através da proteólise, ocorre a liberação do peptídeo C da cadeia

A e B, formando-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 2) (STEINER; OYER, 1967; HUANG; ARVAN, 1995; STEINER, 2011; FU; GILBERT; LIU, 2013).

Figura 2 - Etapas da síntese da insulina.

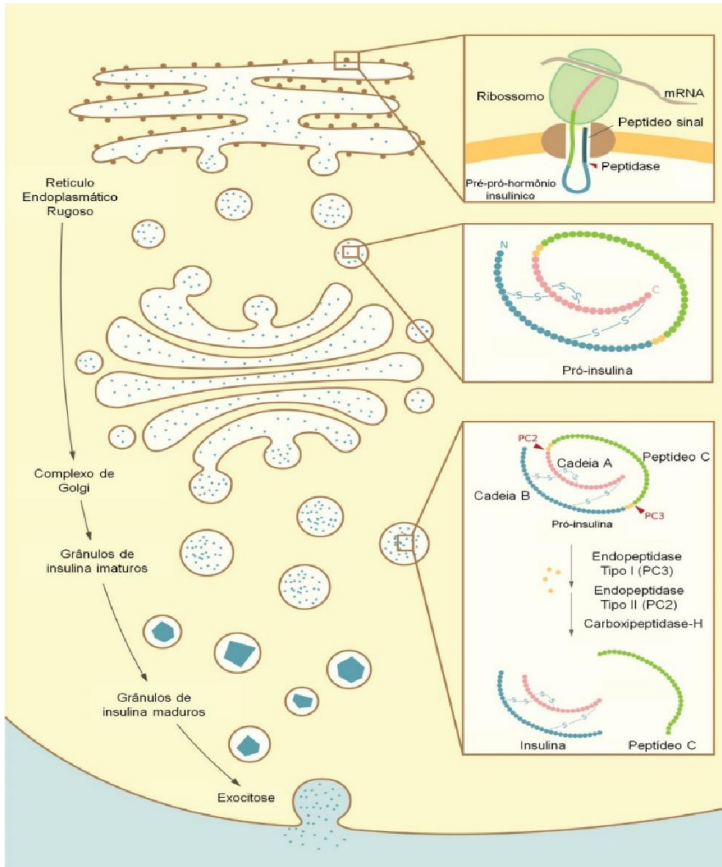


Figura 2 - Após a síntese do pré-pró-hormônio no retículo endoplasmático rugoso, ocorre a clivagem da sequência sinal, por uma peptidase, liberando a pró-insulina. A pró-insulina é transportada para o complexo de Golgi, onde ela é internalizada em vesículas e sofre a maturação final. Inicialmente a pró-insulina sofre a ação da endopeptidase do tipo I (PC3), que cliva na região dos aminoácidos Arg<sup>31</sup> Arg<sup>32</sup>. Após, a endopeptidase tipo II (PC2) cliva o pró-

hormônio em Lys<sup>64</sup> e Arg<sup>65</sup>. Então a carboxipeptidase-H cliva estes dipeptídeos em peptídeos livres. Este processo é essencial para formar a insulina biologicamente ativa, ou seja, separada do peptídeo C (adaptado de: [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin\\_biosynthesis.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Insulin_biosynthesis.svg)).

### 1.1.2.3 Secreção de insulina

Depois de sintetizados, os grânulos de insulina ficam armazenados em um estoque intracelular, que irá fundir-se a membrana após um sinal específico e iniciar o processo de exocitose. Existem múltiplos ativadores da secreção de insulina, como aminoácidos, alguns hormônios gastrointestinais e o metabolismo da glicose. Além disso, 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, dentre todos esses ativadores que auxilia na secreção de insulina pela célula  $\beta$ , a glicose é o principal sensibilizador secretório (HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003).

Com o aumento abrupto da glicose pós-prandial, ocorre a sensibilização da célula  $\beta$ -pancreática, promovendo a secreção de insulina com característica bifásica. A primeira fase é transitória e rápida, com duração de 4 a 10 min (Figura 3). Nesta fase, as vesículas contendo grânulos de insulina ancoradas à membrana, são liberados a partir do estoque de liberação rápida. Esta primeira fase também é conhecida com 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).

Enquanto a concentração de glicose permanecer elevada, um segundo aumento ou fase é observado, esta segunda fase é conhecida fase 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  $\beta$ -pancreática e ativação da síntese do próprio hormônio (STRAUB, SHARP, 2002; HIRIART, AGUILAR-BRYAN, 2008; HENQUIN, 2000; HENQUIN et al., 2003; KAHN et al, 2006).

Figura 3 - Fases de liberação da insulina.

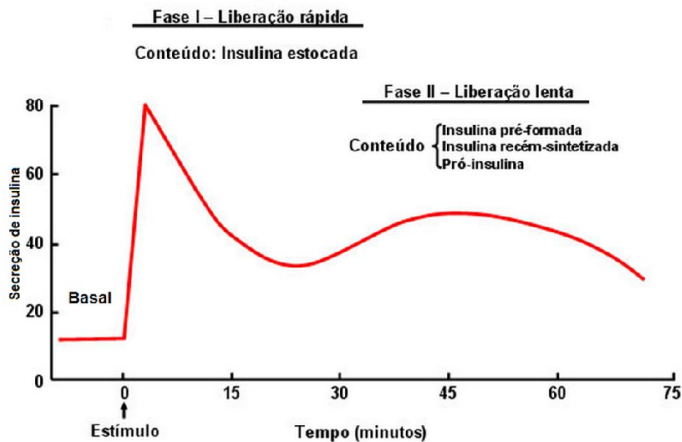


Figura 3 - A liberação de insulina é bifásica. A primeira fase (cerca de 4 a 10 min) resulta da fusão de vesícula de insulina ancoradas a membranas das células  $\beta$ -pancreáticas e tem como principal função estimular a utilização de glicose, ao mesmo tempo inibindo a produção hepática de glicose. A fase posterior tem o objetivo de manter as concentrações basais de glicose.

Sendo assim, quando há elevação da glicemia, concentração maior que 7 mmol/L (126 mg/dL) de glicose, as células  $\beta$ -pancreáticas são expostas à concentrações elevadas de glicose e promovem a internalização deste açúcar através do receptor específico de transporte facilitado GLUT1, em humanos, e pelo GLUT2 em ratos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011), para que esta hexose estimule a secreção de insulina (Figura 4). O GLUT2 possui uma elevada capacidade para transportar a glicose ( $K_m = 15$  e 20 mmol/L). Esta característica permite um rápido e eficiente transporte da glicose após uma sobrecarga de glicose, a favor de gradiente de concentração. Dentro da célula, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato pela glicocinase (hexocinase IV  $K_m = 6$  a 11 mmol/L) ou pela hexocinase I ( $K_m = < 0,1$  mmol/L) (MATSCHINSKY, 1996; RORSMAN; BRAUN, 2013).

No meio intracelular, a glicose-6-fosfato segue a via glicolítica e o metabolismo ocasiona a geração de ATP mitocondrial, aumentando a relação intracelular de ATP/ADP, que conduz ao fechamento de canais de potássio sensíveis à ATP ( $K^+_{ATP}$ ) presentes na membrana das células  $\beta$ . A redução do efluxo de potássio nas células induzido pelo fechamento

de  $K^+_{ATP}$ , gera uma diferença de potencial de membrana, resultando na despolarização da membrana celular. Esta oscilação de voltagem ocasiona a abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem (Cav), permitindo o aumento do 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 dos grânulos de insulina. Esta via de secreção de insulina é classicamente ativada por glicose. No entanto, nutrientes, hormônios ou outros agentes insulíntrópicos, podem ativar distintas vias de sinalização que culminam na secreção de insulina (BOSCHERO; MALAISSE, 1979; KRAMER et al., 2001; HIRIART; AGUILAR-BRYAN, 2008; KOMATSU et al., 2013).



Figura 4 - Mecanismo de secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas.

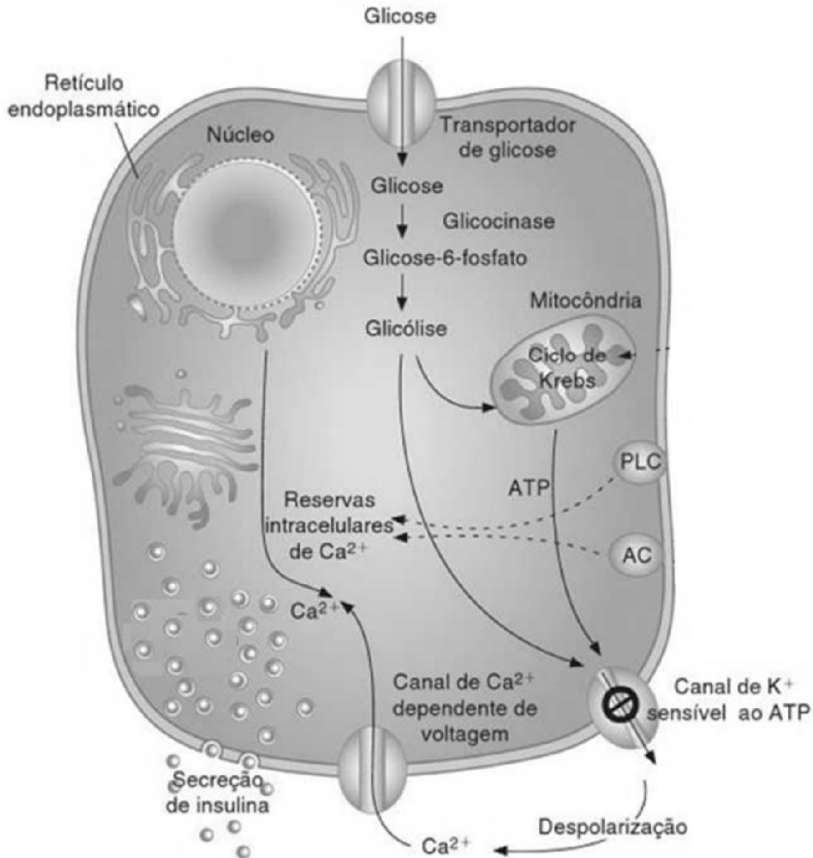


Figura 4 - A glicose é internalizada pelo GLUT2, dentro da célula, o metabolismo gera aumento da relação ATP/ADP. Esse aumento resulta no fechamento dos canais de  $K^+_{ATP}$ , gerando uma despolarização na membrana e consequente abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem. O aumento das concentrações intracelulares de cálcio é o estímulo necessário para que ocorra a fusão de vesículas e liberação de insulina (MOLINA, 2007).

### 1.1.3 Captação de glicose nos tecidos periféricos

Após a exocitose da insulina para a circulação sanguínea, este hormônio age em múltiplos alvos envolvidos na manutenção da homeostasia da glicose, como nos tecidos periféricos responsáveis pela metabolização da glicose, principalmente o tecido muscular, hepático e

adiposo. A captação de glicose por estes tecidos, que necessitam e/ou metabolizam a glicose, é realizada através da família dos GLUTs (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010).

Atualmente são conhecidos 14 membros da família dos GLUTs (GLUTs 1-14), responsáveis pelo transporte facilitado de glicose nos tecidos periféricos, cuja distribuição tecidual, propriedades cinéticas e especificidade de açúcares são variáveis. Essas proteínas são divididas em 3 classes principais. A classe I compreende os GLUTs 1-4 e o GLUT14 e é a classe melhor caracterizada. O GLUT1 está presente nos eritrócitos e células endoteliais e em células  $\beta$  de ilhotas humanas e não dependem da insulina para serem translocados para a membrana celular e desempenharem o papel na captação de glicose. O GLUT2 está presente nos enterócitos e predominantemente em células  $\beta$  de ilhotas de ratos, enquanto o GLUT3 é responsável pela captação de glicose no cérebro, tecido muscular e coração, e ambos, assim como o GLUT1, não dependem da insulina para transportar glicose. O GLUT4 é o transportador de glicose dependente de insulina. O mesmo é expresso nos tecidos denominados insulino-dependentes, como músculo e tecido adiposo (SCHEEPERS; JOOST; SCHURMANN, 2004; THORENS; MUEKLER, 2010; SILVA et al., 2013).

A segunda classe de transportadores GLUTs compreende o GLUT5, GLUT7, GLUT9 e GLUT11. O GLUT5 transporta frutose no intestino e é expresso também em testículos e rins. O GLUT7 também está presente no intestino, cólon, testículos e próstata. GLUT9 é encontrado nos rins e fígado. Enquanto o GLUT11 é o transportador em tecidos com baixa afinidade por glicose e também pode transportar frutose. Já a classe III corresponde aos GLUTs 6, 8, 10 e 12 e inclui o transportador de  $H^+$  ligado ao mio inositol (HMIT). O GLUT6 é também expresso no cérebro de leucócitos e vesícula biliar, GLUT8 nos testículos e o GLUT10 no fígado e pâncreas, enquanto que, o 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).

A captação de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo ocorrem através do estímulo e vias de sinalização da insulina. A insulina tem como principal ação nos tecidos sensíveis à insulina, desencadear a translocação dos transportadores GLUT4 dos estoques intracelulares para a membrana, para que o mesmo possa transportar a glicose para o interior da célula. Em condições basais, o GLUT4 está localizado em compartimentos intracelulares responsivos a insulina conhecidos como

estruturas túbulo vesiculares (BOSE et al, 2002). A translocação do GLUT4 destes compartimentos até a membrana acontece devido ao estímulo da insulina, e quando este estímulo é cessado, ocorre a internalização dos transportadores através da endocitose com fragmentos de membrana plasmática na forma de vesículas (HOU; PESSIN, 2007; KAHN; PESSIN, 2002; WATSON; PESSIN, 2007; LETO; SALTIEL, 2012)

O mecanismo de captação de glicose estimulado por insulina inicia com a ligação da insulina liberada da célula  $\beta$ -pancreática ao receptor de membrana (RI) e consequente ativação da atividade tirosina cinase do mesmo. O receptor, por sua vez, quando ativado promove a fosforilação das proteínas substratos do receptor de insulina, IRS-1 e IRS-2, que quando ativadas fosforilam proteínas com domínios SH2, como a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3-cinases (PI3K). A PI3K, catalisa então a formação de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) que funciona como segundo mensageiro intracelular e regula a localização e atividade da PDK-1 e PDK-2 (mTORC2). Após, as PDK-1 e PDK-2 fosforilam e ativam a proteína cinase B (PKB) (Figura 5) e isoformas de proteína cinase C (PKC) atípicas ( $\xi$ ,  $\lambda$ ) (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; KAHN; PESSIN, 2002; TAHA; KLIP, 1999; HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; WATSON; PESSIN, 2007; KLIP, A., 2009)

Sendo assim, a PKB (ou Akt) possui a capacidade de regular a captação de glicose através do aumento da translocação dos transportadores de glicose GLUT4 para a membrana através da fosforilação da proteína AS160 (um substrato de 160 kDa da Akt), que possui domínios de proteína ativadora de GTPases (GAP). A análise da estrutura de domínio de AS160 revelou que esta proteína contém dois domínios de ligação de fosfotirosina (PTB) no terminal NH2 e um domínio Rab-GAP (proteína de ativação de GTPase) no terminal COOH. A atividade Rab-GAP promove a hidrólise de GTP em GDP através de proteína (s) Rab nas vesículas de armazenamento de GLUT4 (GSV). Na sua forma inativa, ligada a GDP, as Rabs são incapazes de induzir a translocação de GLUT4 para a superfície celular. No entanto, após a estimulação da insulina, a AS160 é fosforilada, o que leva à inativação da atividade Rab-GAP da mesma, não ocorrendo então à hidrólise do GTP em GDP. Assim, as Rabs associadas às GSV ficam ligadas ao GTP e são capazes de promover os processos que levam à mobilização de GLUT4 na membrana plasmática (Figura 5). Além disso, a AS160 parece estar envolvida na reorganização do citoesqueleto. (LIU et al., 2006; TANIGUCHI et al., 2006; HOU; PESSIN, 2007; WATSON; PESSIN,

2007; HOFFMAN; ELMENDORF, 2011; WATSON; PESSIN, 2007; KLIP, A., 2009; LETO; SALTIEL, 2012; SAKAMOTO, K.; HOLMAN, G. D., 2008)

Figura 5 - Sinalização periférica da insulina.

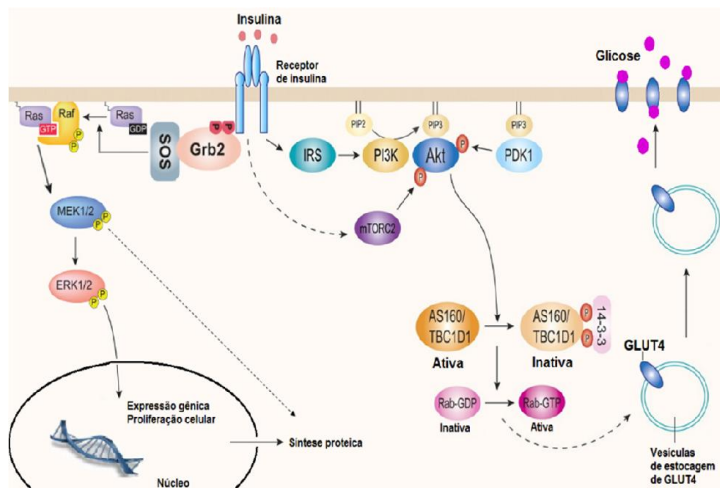


Figura 5 – A insulina, ao se ligar ao receptor, ativa a atividade tirosina cinase do mesmo, que agora é capaz de fosforilar substratos do receptor de insulina que ativa a PI3K, que quando ativada catalisa a formação do PIP3. O PIP3 ativo modula a localização e atividade das proteínas PDK1 e mTORC2, ambas agora possuem a capacidade de fosforilar a AKT, que quando ativada ela fosforila a AS160, o que leva à inativação da atividade Rab-GAP da mesma, não ocorrendo então à hidrólise do GTP em GDP. Assim, as Rabs associadas às GSV ficam ligadas ao GTP e são capazes de promover os processos que levam à mobilização de GLUT4 na membrana plasmática da célula. Além disso, quando o receptor de insulina está ativo, também tem a capacidade de desencadear a via das MAPK, que resulta em aumento da expressão gênica e proliferação celular, assim como modula a síntese proteica, principalmente através da ativação de fatores de alongamento (EF) presentes na etapa de alongamento da tradução proteica (adaptado de SAKAMOTO, K. & HOLMAN, G.D., 2008).

Após a translocação das vesículas contendo GLUT4 para a membrana plasmática, ocorre o processo de acoplamento e fusão das mesmas com a membrana. A maquinaria mínima e universal para a fusão de membranas em eucariotos é constituído por um complexo ternário SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive fator (NSF) attachment receptor) (Receptor de ligação ao fator solúvel sensível à N-

etilmaleimida) e uma proteína da família Sec1/Munc18 (SM) (STÖCKLI, J. FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E., 2011; WATSON; PESSIN, 2007; LETO; SALTIEL, 2012; BRYANT, N. J.; GOULD, G. W., 2011).

Adicionalmente a esse processo através das SNAREs, os microtúbulos e os filamentos de actina apresentam funções importantes no tráfego do GLUT4, principalmente pelo direcionamento do movimento das vesículas da região perinuclear para a membrana em resposta à insulina. (CHANG; CHIANG; SALTIEL, 2004; HOU; PESSIN, 2007; LETO; SALTIEL, 2012; SEMIZ, 2003)

O músculo e o tecido adiposo são os principais tecidos responsáveis pela captação de glicose plasmática em resposta à insulina *in vivo* e o GLUT4 é a isoforma predominante deste transportador expressa nesses tecidos. No entanto, a disparidade entre a translocação do GLUT4 para a membrana e a captação de glicose pelos tecidos periféricos é frequentemente estudada, e estudos já indicam que há um aumento na atividade intrínseca do GLUT4 além da translocação induzida via PI3K (FURTADO et al., 2003). Esta via independente de PI3K, mas complementar, como a via da p38 MAPK, provavelmente influencia no estado de fosforilação do GLUT4 na membrana plasmática (FURTADO et al., 2003, CAZAROLLI et al., 2013; TREMBLAY et al., 2003).

Além disso, a insulina desencadeia vias de sinalização que participam amplamente no crescimento e diferenciação celular, tais como as vias de MAPK. As vias nucleares (via MAPK e MEK) estão envolvidas na regulação de várias atividades celulares como a estimulação da expressão de transportadores de glicose, assim como outras proteínas das vias de sinalização celular, expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, além de modular a ativação de fatores de alongamento da tradução proteica, como cascata da cinase eEF2K (Figura 5) (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; RISCO & CUENDA, 2012; JUNG et al., 2011; TAHA; KLIP, 1999).

### 1.2.3 Síntese de glicogênio

Nos tecidos de mamíferos, os carboidratos são estocados principalmente na forma de glicogênio, sendo que o fígado e o músculo esquelético são os dois principais tecidos de armazenamento. Além deles, outros tecidos como músculo liso e cardíaco, rins, cérebro e tecido adiposo também possuem a capacidade de sintetizar e estocar glicogênio (WANG; MUSCAT, 2013; ZOIS; FAVARO; HARRIS, 2014; RICHTER, HARGREAVES, 2013)

A insulina regula a síntese de glicogênio em duas etapas: a primeira através do controle da captação de glicose e a segunda pela

regulação dos estados de fosforilação e ativação das enzimas envolvidas na síntese e degradação do glicogênio. Os mecanismos moleculares pelos quais a insulina regula o metabolismo do glicogênio são complexos e podem variar entre diferentes tipos celulares (ROACH, 2002; WANG; MUSCAT, 2013; ZOIS; FAVARO; HARRIS, 2014; RICHTER, HARGREAVES, 2013; ROACH et al., 2012; HALSE et al., 2001).

A glicose 6-fosfato (G-6-P) é convertida a glicose 1-fosfato (G-1-P) pela enzima fosfoglicomutase e, a seguir, convertida em uridinadifosfato glicose (UDP-G) pela enzima uridina-difosfato glicose pirofosforilase. A UDP-G formada serve como doador de unidades glicosil para a cadeia de glicogênio nascente. Essa reação é catalisada pela enzima glicogênio sintase (GS), ponto chave na síntese de glicogênio. Além da GS, uma proteína iniciadora chamada glicogenina e uma enzima ramificadora 25 também contribuem para o processo de síntese e armazenamento de glicogênio (Figura 6) (FERRER et al., 2003; ROACH et al., 2012; BECK-NIELSEN, 2012; BOUSKILA et al., 2010; MARKAN, JURCZAK, BRADY, 2010; SOMSÁK et al., 2008)

A GS é uma proteína multimérica e a atividade é regulada por mecanismos alostéricos e de fosforilação/desfosforilação. Duas isoformas desta enzima são descritas em mamíferos, uma expressa no fígado e a outra no músculo e em diversos outros tecidos (ROACH, 2002; BECK-NIELSEN, 2012)

Figura 6 - Síntese de glicogênio.

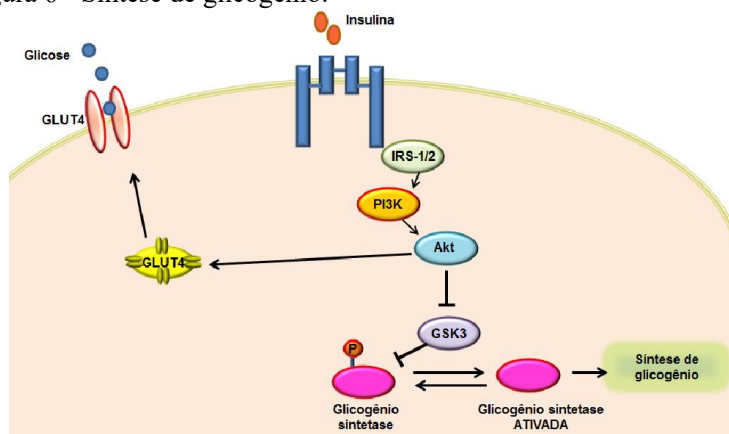


Figura 6 - A síntese de glicogênio inicia com a ativação de IRS1/2. E através de uma cascata de ativação de uma série de proteínas, resulta a ativação da Akt. Akt ativa, inibe GSK3, fazendo com que a enzima glicogênio sintetase fique ativa e a

síntese de glicogênio ocorra (adaptado de PHILIP COHEN & MICHEL GOEDERT, 2004).

O processo de degradação das moléculas de glicogênio é feito pela enzima glicogênio fosforilase. Esta produz glicose 1-fosfato que é convertida em glicose 6-fosfato e, no fígado através da glicose 6-fosfatase, enzima que está presente no fígado e rins, irá originar moléculas de glicose livre (FERRER et al., 2003; ROACH, 2002; ROACH et al., 2012; ZOIS; FAVARO; HARRIS, 2014).

## 1.2 Diabetes Melito

### 1.2.1 Aspectos gerais

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 2014 existiam 387 milhões de pessoas afetadas pela doença no mundo. Estimativas apontam que até 2035 a diabetes atingirá 592 milhões de pessoas, o que representa um aumento de 55%. Ainda, em 2014 ocorreram 4,9 milhões de mortes decorrentes da diabetes, cerca de uma morte a cada 7 segundos. Além disso, 77% da população diabética está em países de baixa e média renda. 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. Um dado preocupante também são quanto às pessoas não diagnosticadas, estima-se que cerca de 179 milhões de pessoas tenha a doença e não sabem (IDF, 2014).

Dentre as crianças, os números também preocupam, mais de 21 milhões de nascidos vivos foram afetados pela diabetes durante a gravidez em 2013 e mais de 79 mil crianças desenvolveram diabetes tipo 1 em 2013. Além das vidas perdidas, ainda há uma grande despesa monetária por conta deste distúrbio, 612 bilhões de dólares, cerca de 11% de todos os gastos em saúde com adultos, foi causado pela diabetes. Estes dados mostram claramente que a diabetes é uma epidemia mundial e um grave problema de saúde pública (IDF, 2014).

No Brasil, o número de pessoas portadoras da doença atingiu 11,6 milhões em 2014, além de 3,2 milhões ainda não diagnosticados. 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, 2014).

Este aumento progressivo da doença é devido principalmente ao envelhecimento da população, urbanização crescente e adoção de estilos de vida pouco saudáveis, como sedentarismo, dieta inadequada e

obesidade. A alta ingestão de alimentos e/ou a ingestão de alimentos com alta carga energética altera o sistema homeostático que requer um equilíbrio entre oferta e demanda energética. Este desequilíbrio nutricional acarreta em 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; BRASIL, 2006).

A diabetes melito (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, crônico-degenerativa, ocasionada por uma disfunção no metabolismo dos carboidratos de etiologia múltipla, caracterizada pela hiperglicemia, que é resultante de defeitos na ação e/ou na secreção de insulina. O estado hiperglicêmico crônico está associado a muitas complicações observadas nos pacientes diabéticos, como disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (BRASIL, 2006; JAMES et al., 2003; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; GOMES, 2009).

A classificação da DM utilizada atualmente aceita pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e pela OMS foi proposta em 1997 pela Associação Americana de Diabetes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA). Ela é classificada de acordo com a etiologia da doença, desta forma, é classificada em quatro categorias, que são: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e DM gestacional (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

A DM tipo 1 compreende 5-10% dos casos, sendo resultante da destruição das células beta ( $\beta$ )-pancreáticas que leva à deficiência absoluta de insulina, destruição essa que pode ser de causa autoimune ou idiopática. Por outro lado, a DM tipo 2 abrange 90-95% dos casos e é o resultado da resistência periférica, em graus variados, à insulina, ou seja, está relacionada à diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos e a um aumento na produção hepática de glicose e deficiência relativa de secreção da insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas. Este último tipo, a DM tipo 2, pode ocorrer em qualquer idade, porém geralmente é diagnosticado após os 40 anos, sendo que os pacientes na maioria apresentam sobrepeso ou obesidade (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; WEIR et al., 2001; BROWLEE, 2001).

O surgimento de intolerância à glicose, resistência à insulina e/ou alterações na secreção está associado à diversos mecanismos moleculares. Fatores inflamatórios e proteínas interferem na sinalização insulínica impedindo que a via de sinalização culmine com a secreção ou síntese de



insulina. Estes efeitos ocorrem a partir de fosforilações em proteínas essenciais para a sequência de sinalização insulínica que resulta na inativação das mesmas, impedindo a continuação da cascata de sinalização. Assim como os ácidos graxos, 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).

No entanto, a característica mais preocupante e principal causa das mortes causadas por este distúrbio, são as complicações inerentes à doença. As complicações da DM são descritas por apresentarem origens multifatoriais, pois a hiperglicemia crônica nestes pacientes desencadeia uma série de alterações que culminam com o surgimento das complicações micro e macrovasculares e o desenvolvimento e progressão de muitas doenças. 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, um processo bioquímico que resulta na formação dos produtos finais de glicação avançada, também chamados AGEs (*Advanced Glycated End-Products*) (GOH; COOPER, 2008; PEPPA et al., 2003; PEPPA; VLASSARA, 2005).

### 1.2.2 Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) e as complicações da Diabetes

Os AGEs são um grupo heterogêneo de moléculas formadas a partir da reação de glicação não enzimática entre a porção aldeídica ou cetônica de açúcares redutores e resíduos amino de proteínas, lipídios ou ácidos nucléicos (Figura 7). A reação de formação de AGEs pode ser separada em três fases. Na primeira ocorre a glicação não enzimática, onde o grupamento carbonila do açúcar redutor se condensa com o grupo amina livre da proteína formando a base de Schiff que, após sofrer rearranjo, origina os produtos de Amadori, estruturalmente mais estáveis. A hemoglobina glicada (HbA1c) e a frutossamina são conhecidos exemplos de produtos de Amadori. Na fase intermediária, os produtos de Amadori são transformados em uma série de compostos dicarbonílicos como glioxal, metilglioxal e glicolaldeído, através de oxidações e desidratações. A última fase compreende a reação do dicarbonil novamente com os grupamentos amina primárias acessíveis, formando um composto irreversível chamado AGE. A inibição de qualquer uma destas três fases pode reduzir a formação dos AGEs e beneficiar o

tratamento de doenças como câncer, aterosclerose e diabetes (BASTA et al., 2004; CALCUTT et al., 2009).

Figura 7 - Formação dos Produtos Finais de Glicação (AGEs).

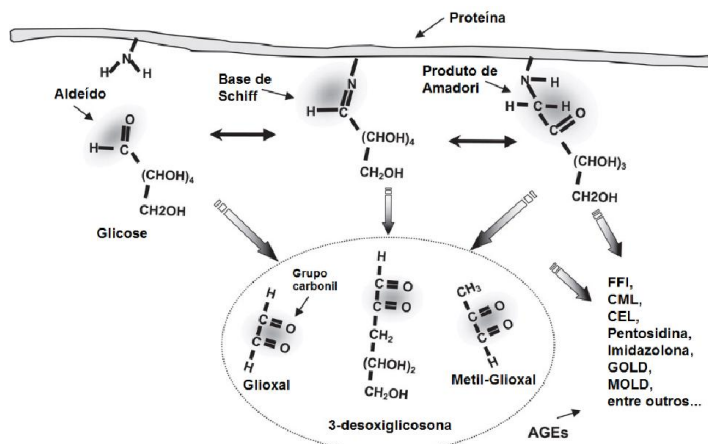


Figura 7 – Reações de formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (adaptado de BASTA, G. SCHMIDT, A. M., CATERINA, R. 2004).

Além da síntese endógena de AGEs, muitos podem ser obtidos a partir de fontes exógenas. Além disso, em pacientes diabéticos, a quantificação da HbA1c, a qual carrega um produto de Amadori na cadeia  $\beta$ , é usada como indicativo de hiperglicemia dos últimos três meses, sendo considerada um importante marcador da progressão da diabetes (RAHBAR, 2005; 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, desta forma a determinação da fluorescência pode ser usada como um marcador de formação dos AGEs. 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 tecidos, como o 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 e o processo de glicação avançada ocorre durante um período prolongado de hiperglicemia, contribuindo para o

desenvolvimento das complicações da diabetes. 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 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 (BASTA et al., 2004; VLASSARA; PALACE, 2003; BROWNLEE, 2001, 2005; AHMED, 2005; JAKUS; RIETBROCK, 2004; OTT et al., 2014). Os AGEs também podem promover a glicação de lipoproteínas plasmáticas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL), favorecendo depósito e formação de placas ateroscleróticas e a lipoproteína de alta densidade (HDL), deixando-a inativa (DREW et al., 2012; AHMED, 2005; GOLDIN et al., 2006).

A progressão da diabetes pode causar danos altamente prejudiciais e geralmente pode ser a forma letal da doença. Dessa forma, é de extrema importância estudos nesse contexto. Além disso, atualmente, substâncias com capacidade anti-AGE é um dos principais focos de estudos para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

### 1.2.3 Tratamento da diabetes

Pacientes diabéticos frequentemente apresentam um modelo complexo de desordens metabólicas e fisiológicas, incluindo hiperglicemia, hipertensão, obesidade e hiperinsulinemia. Atualmente, várias estratégias terapêuticas são utilizadas para o tratamento da diabetes. Em geral, o tratamento inicial da diabetes envolve terapias não medicamentosas relacionadas às mudanças no estilo de vida, especialmente quanto ao equilíbrio nutricional, prática de exercícios físicos e controle de peso. No entanto, quando o controle glicêmico adequado não é atingido por meio de alternativas não medicamentosas, é indicada a terapia com fármacos antidiabéticos, com o objetivo de controlar a glicemia e prevenir e/ou reduzir a severidade das complicações oriundas desta patologia (FOWLER, 2007; KOSKI, 2006; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009; MERCK, 2014).

A escolha do tratamento, monoterapia ou associação entre medicamentos, segue critérios que devem ser avaliados, tais como o peso e idade do paciente, os valores das glicemias de jejum e pós-prandial, valores da hemoglobina glicada (HbA1c), presença de complicações, outros distúrbios metabólicos e doenças associadas, assim como possíveis interações com outros medicamentos, reações adversas e contra-indicações (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

Uma das principais terapias medicamentosas utilizadas para o tratamento da DM tipo 2 é a utilização de antidiabéticos orais. Estes são fármacos que tem como finalidade reduzir a glicemia e mantê-la em concentrações normais (inferior a 99 mg/dL em jejum). Eles podem ser divididos de acordo com o mecanismo de ação em: os que incrementam a secreção de insulina (sulfoniluréias e glinidas); os que diminuem a produção hepática de glicose (biguanidas); os que aumentam a utilização periférica de glicose (glitazonas); e os que reduzem a velocidade de absorção de glicídios (inibidores das alfa-glicosidases) e mais recentemente os análogos do GLP-1, os inibidores de DPPIV e os inibidores da reabsorção renal de glicose (SCHEEN; LEFEBVRE, 1998; SHARIF, 2011).

Além dessas classes farmacológicas citadas, os pacientes portadores da DM tipo 1 e, eventualmente, da DM tipo 2, fazem utilização de análogos da insulina. Na DM tipo 1 não há produção endógena de insulina, o que requer a administração diária da mesma. Enquanto que na DM tipo 2 o tratamento insulínico pode ser requerido quando a doença progride para a perda da capacidade do pâncreas em produzir ou liberar insulina (MERCK, 2014). Diante do exposto, a busca por novos tratamentos antidiabéticos, ainda é constante. Além disso, as formas de tratamento existentes não mimetizam eficientemente o controle glicêmico proporcionado pelas células envolvidas neste distúrbio, não prevenindo, dessa forma, a evolução letal da doença. Para tanto, muitos grupos de pesquisa estudam novas alternativas de tratamento antidiabético com o objetivo de melhorar o controle glicêmico, bem como outros mecanismos e parâmetros envolvidos com as complicações provenientes da hiperglicemia (YI, 2013; HUNG et al, 2012).

### 1.3 Plantas medicinais e compostos naturais

#### 1.3.1 Plantas medicinais como alvos terapêuticos da diabetes

Uma das fontes de maior foco para esta busca é o conhecimento popular aplicado ao uso de plantas medicinais com potencial efeito na diabetes. O acúmulo de conhecimentos empíricos versando sobre as plantas medicinais que são transmitidos desde as antigas civilizações até os dias de hoje, faz com que estas sejam amplamente utilizadas na medicina popular. 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. Além dos antidiabéticos orais, muitas plantas são cientificamente catalogadas para o uso como antidiabéticos (CALIXTO, 2000; NEGRI, 2005).

Atualmente, mais de 1000 espécies vegetais já foram descritas quanto às propriedades antidiabéticas, sendo estas ações associadas a inúmeros compostos presentes nas mesmas. O Brasil é detentor de uma das floras mais ricas do mundo em matérias primas para fitoterápicos o que torna indispensável o estabelecimento de bases científicas para o emprego destes produtos na terapêutica. No entanto, poucas das muitas espécies catalogadas, foram estudadas quanto às atividades biológicas (MUKESH; NAMITA, 2013; SIMÕES, 1984; SILVA et al., 2002; ZAREBA et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2006; LEDUC et al., 2006).

Uma das classes mais estudadas em relação as atividades biológicas são os polifenóis. Os polifenóis são metabólitos secundários de plantas e são encontrados em grande parte nas frutas, vegetais, cereais e bebidas, dessa forma, estão presentes na dieta humana. Diversas atividades biológicas e propriedades benéficas já estão bem descritas para os polifenóis e muitos estudos sugerem que o consumo em longo prazo de dietas ricas em polifenóis, incluindo os ácidos fenólicos e flavonóides, está associado à proteção contra algumas doenças, como por exemplo doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, entre outras (CAZAROLLI et al., 2008; PANDLEY; RIZVI, 2009; SILVA et al., 2013; BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; VAUZOUR et al, 2010; MANACH, MAZUR, SCALBERT, 2005). No entanto, o mecanismo de ação desses nutracêuticos ainda não está totalmente compreendido e necessita de mais estudos, assim como a investigação de novas classes de compostos com atividades antihiperlipidêmica.

Alguns dos fármacos atualmente utilizados no tratamento da diabetes têm origem em plantas, como a metformina que foi desenvolvida a partir de um protótipo (galegina) que foi identificado nas flores da espécie *Galena officinalis* e acarbose isolada da *Actinoplances* spp., (OUBRÉ et al., 1997; LEDUC et al., 2006; NEWMAN; CRAGG, 2007).

### 1.3.2 *Ilex paraguariensis*

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incentiva a utilização de plantas como recurso para o tratamento de doenças, como a diabetes. Acredita-se que esta alternativa possa beneficiar 80% da população mundial que se utiliza de plantas como primeiro recurso terapêutico. Encontram-se na literatura muitas plantas, cujos princípios ativos são eficientes no tratamento da diabetes. Entre estas, podemos destacar *Ilex paraguariensis* St. Hil.var. *paraguariensis* (IP), pertencente da família *Aquifoliaceae* (Figura 8). Extratos ou infusões das folhas de IP foram

relatados por exibir efeito inibidor na absorção da glicose e na inibição da formação de produtos finais de glicação (YAMADA, 1998; PEREIRA et al., 2012). No entanto não existem muitos relatos na literatura sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos a curtos e longo prazo desta planta na melhoria do estado hiperglicêmico.

Figura 8 - *Ilex paraguariensis* St. Hil.var. *paraguariensis*.



Figura 8 - *Ilex paraguariensis* St. Hil.var. *paraguariensis* (BERTÉ; RUCKER; HOFFMANN-RIBANI, 2011).

*IP* é uma espécie arbórea que cresce naturalmente em regiões de clima temperado e subtropical do Brasil, Paraguai e Argentina, é usado para fazer uma bebida estimulante chamado chimarrão, tererê, ou mate. Esta bebida é comumente consumida nas regiões frias da América do Sul, sendo preparada como infusão quente, de folhas ou caule secos. Além disso, outra bebida apreciada pelo aroma agradável é o chá preto ou chá de mate ao leite, preparados com folhas secas, moídas e torradas de *I. paraguariensis*, sendo consumidos diariamente como chá quente ou chá-mate gelado (BRACESCO et al., 2011).

Muitos estudos já demonstram efeitos benéficos de extratos de *IP* tanto na diabetes, como na obesidade e resistência à insulina. Entre estas ações, encontra-se uma melhoria da sinalização insulínica hepática (AÇARI et al., 2013), a redução da inflamação associada à obesidade de baixo-grau (PIMENTEL et al., 2013), redução da glicemia, do colesterol

e triglicerídeos plasmáticos em animais submetidos à uma dieta rica em gordura (KANG et al., 2012), capacidade antioxidante (VALERGA et al., 2012; MEJÍA et al., 2010; SCHINELLA et al., 2009), entre outros.

As atividades descritas estão associadas à presença de várias classes de compostos biologicamente ativos. Na constituição fitoquímica de *IP* já foi confirmada a presença de ácidos fenólicos, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido 3,4-dicafeoilquínico, ácido 3,5- dicafeoilquínico e ácido 4,5-dicafeoilquínico, vitaminas do complexo A, C e E, taninos, flavonóides como rutina, canferol e quercetina (FILIP et al., 2001), saponinas triterpênicas derivadas dos ácidos ursólico (matessaponinas), metilxantinas, como a teobromina e a cafeína, (MARTINET et al., 2001; BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; MENINI et al., 2007; PEREIRA et al., 2012) e oleanólico (WILSON et al., 1981; REGINATTO et al., 1999).

Nosso grupo já demonstrou os efeitos das principais frações e extratos de dois tipos de *IP*, verde e tostada, de diferentes regiões na homeostasia da glicose (PEREIRA et al., 2012). No entanto, o papel que cada classe de compostos desempenha nas ações biológicas de *IP* ainda não está totalmente estabelecido e necessita de mais estudos. O ácido cafeico, por exemplo, desempenha um papel na secreção da insulina estimulada pela glicose, mas o mecanismo pelo qual ele atua para que ocorra a secreção deste hormônio ainda não está elucidado (BHATTACHARYA et al., 2013; TOUSCH et al., 2008).

Além do ácido cafeico, demais compostos, como o ácido clorogênico, ácido ursólico, quercetina, rutina, entre outros presentes na *IP*, apresentam efeitos farmacológicos, dentre eles, ações na diabetes e resistência à insulina (CASTRO et al, 2015; KAPPEL et al, 2013a; KAPPEL et al, 2013b; KAPPEL et al, 2013c; ONG et al, 2013; MCCARTY et al, 2005; EID et al, 2015; ALAM; AHMAD; NASEEM, 2015). Estes efeitos apontam os inúmeros benefícios desta planta, observados em diversos modelos animais, bem como, em estudos conduzidos com humanos (BOAVENTURA, 2013; KLEIN, 2011). Sendo assim, o estudo dos extratos e frações de *Ilex paraguariensis*, já realizado pelo nosso grupo (PEREIRA et al., 2012) e de compostos isolados da mesma, como potenciais antihiperlipidêmicos se torna relevante, em virtude do quadro epidemiológico instalado em relação ao diabetes, bem como, das poucas investigações relacionadas a ação antidiabética destas espécies, além do fato relevante de ser um produto natural amplamente utilizado pela população, principalmente da região sul do Brasil.

## 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, sejam adotadas para evitar o aumento da prevalência, bem como, os elevados gastos públicos (FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES, 2015).

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 procuram novas alternativas de tratamento antidiabético com o objetivo de melhorar o controle glicêmico, bem como outros mecanismos e parâmetros envolvidos com as complicações provenientes da hiperglicemia (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 na diabetes. Encontram-se na literatura muitas plantas, cujos princípios ativos são eficientes no tratamento da diabetes. A linha de pesquisa de vias de sinalização relacionadas à homeostasia da glicose do Laboratório de Hormônios & Transdução de Sinais investe esforços desde 2002 com o objetivo de caracterizar 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 paradisiaca*, *Rosmarinus officinalis*, *Croton heterodoxus* Baillon entre outras, são detentoras de compostos com significante efeito antihiper-glicêmico, secretagogos de insulina e/ou insulino-miméticos. (KAPPEL et al., 2012; KAPPEL et al, 2013d ; ZANATTA et al., 2007; FOLADOR et al., 2010; SILVA et al., 2002; CAZAROLLI et al., 2006; CAZAROLLI et al., 2009 ; CASTRO et al., 2014, 2015). Tendo como base a experiência em análise das respostas biológicas obtidas até o momento, o efeito anti-hiperglicêmico e/ou insulino-mimético já reportados por este grupo, e a atual utilização de técnicas já padronizadas em uso sistemático no laboratório, 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 de extratos e compostos isolados seletivamente de



*Ilex paraguariensis* torna-se relevante, pois, entre os poucos estudos existentes, alguns compostos foram efetivos no controle glicêmico. Além disso, representam uma alternativa terapêutica com potencial efeito biológico para o controle da diabetes.

Este grupo já iniciou os estudos com *IP*, investigando a ação de diferentes frações e extratos na homeostasia da glicose. Apoiado nisso, após revisão bibliográfica, foram identificados que alguns compostos presentes em *IP* ainda não foram estudados completamente quanto ao mecanismo de ação e efeitos biológicos envolvidos na homeostasia da glicose, ainda que abriguem compostos com potencial terapêutico. De acordo com esta pesquisa na bibliografia e na quantificação fitoquímica realizada pelo doutorando Carlos Henrique Blum da Silva, do Laboratório de Farmacognosia do departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC, coordenado pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto, destacamos a teobromina e o ácido cafeico. Quanto ao ácido cafeico, já há relatos na literatura quanto a ação secretagoga de insulina, no entanto, o mecanismo de ação deste composto ainda não foi elucidado (BHATTACHARYA et al., 2013). Enquanto que para a teobromina, um dos principais componentes do chocolate, que parece melhorar a sensibilidade à insulina, existem pouquíssimos estudos envolvendo a homeostasia glicêmica (GRASSI et al., 2005). Diante do exposto, este estudo teve como objetivo caracterizar a ação antihiper glicêmica e/ou anti-hipoglicemiante de compostos criteriosamente selecionados que estão presentes em *Ilex paraguariensis*, bem como, a identificação de alvos celulares/moleculares da ação destes compostos com ações biológicas relevantes na homeostasia da glicose foram focos deste estudo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar o mecanismo de ação de compostos selecionados, presentes na espécie *Ilex paraguariensis* (IP) com potencial efeito antidiabético em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Assim como avaliar a ação de compostos selecionados na absorção intestinal de glicose, via SGLT1 em um modelo experimental *in situ*.

#### 3.2 Objetivos específicos:

1. Determinar o efeito antihiper-glicêmico e/ou hipoglicemiante (tolerância à glicose) após tratamento agudo por via intraperitoneal com ácido cafeico e teobromina, presentes em *Ilex paraguariensis* (IP), em ratos em estado hiper-glicêmico.
2. Avaliar o efeito antihiperlipidêmico da teobromina em ratos com aumento na concentração de triglicérides, por um período agudo de tratamento, por via oral.
3. Estudar o efeito do ácido cafeico e teobromina, presentes em IP em estudos *in vitro* na atividade de dissacaridases intestinais (maltase, lactase e sacarase).
4. Determinar o efeito de compostos selecionados, em estudos *in situ* na atividade do co-transportador SGLT1 no intestino de ratos, comparando com um inibidor conhecido do SGLT1.
5. Estudar o efeito *in vitro* do ácido cafeico no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas (vias de sinalização intracelular no efeito secretagogo) e consequente secreção de insulina em células pancreáticas.
6. Determinar o conteúdo de glicogênio muscular e hepático após tratamento agudo por via intraperitoneal com ácido cafeico e teobromina, presentes em *Ilex paraguariensis* (IP), em ratos em estado hiper-glicêmico.
7. Estudar o efeito *in vitro* da teobromina em estudo na captação de <sup>14</sup>C-deoxi-D-glicose no músculo sóleo de ratos normoglicêmicos, investigando o possível mecanismo de ação na síntese e/ou translocação do GLUT4.
8. Avaliar o efeito *in vivo* da teobromina em modelos de ratos resistentes à insulina, induzida por dexametasona, através do teste de tolerância à insulina (ITT) e avaliação clínica do perfil lipídico dos ratos através de ensaios com kits específicos.

9. Estudar o efeito do ácido cafeico e teobromina, presentes em *IP* em estudos *in vitro* na glicação de proteínas séricas (glicose e frutose + albumina).
10. Avaliar o efeito do ácido cafeico e teobromina, presentes em *IP*, após tratamento *in vivo*, em ratos em estado hiperglicêmico, na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Material

Albumina bovina sérica (BSA), N-[2-(p-bromocianamylamino)etil]-5-isoquinolinesulfonamida (H-89), nifedipina, diazoxide e demais bloqueadores e inibidores utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma Aldrich Chemical Company® (St. Louis, MO, EUA). Glicose e 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) foi adquirido da Millipore (St. Charles, MO, Estados Unidos da América). [U-<sup>14</sup>C]-2-Deoxi-D-glicose (<sup>14</sup>C-DG), atividade específica 9.25 GBq/mmol, [<sup>45</sup>Ca]CaCl<sub>2</sub> (sp. act. 321 KBq/mg Ca<sup>2+</sup>) e Optiphase Hisafe líquido de cintilação biodegradável foi adquirido da Perkin-Elmer Life e da Analytical Sciences (Boston, MA, EUA).

### 4.2 Obtenção e solubilidade dos compostos

O ácido cafeico e a teobromina foram obtidos comercialmente, da empresa Sigma Aldrich Chemical Company® (St. Louis, MO, EUA), sob os códigos correspondentes, C0625 e T4500.

Canferitrim foi isolado a partir da folha da *Bauhinia forficata* Link (PIZZOLATTI et al., 2003); a quercetina, hispidulina e naringenina foram isoladas a partir de *Baccaris pseudotenuifolia* (MOREIRA et al., 2003); catequina foi obtida a partir de casca da *Croton celtidifolius* Baill (NARDI et al., 2006); fukugetin foi isolado a partir de folhas da *Rheedia gardneriana* (VERDI et al., 2004); a rutina foi obtida a partir da *Polygala paniculata* (LAPA et al., 2009) e a miricitrina foi isolada a partir de folhas de *Eugenia uniflora* (MEOTTI et al., 2006).

Os compostos foram solubilizados na solução veículo de cada metodologia na presença de 5% de tween quando não estavam solúveis no veículo.

### 4.3 Animais

Ratos Wistar machos (180-200 g) entre 50-55 dias, obtidos do biotério central da UFSC, 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 ratos 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 animais foram monitorados e mantidos em concordância com as recomendações do Conselho Brasileiro de Medicina Veterinária e do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. 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 à glicose

Neste estudo, foi utilizado um modelo animal de hiperglicemia amplamente utilizado neste grupo de pesquisa (CAZAROLLI et al., 2009; FREDERICO et al., 2012) e adaptado para o estudo intraperitoneal (LIU et al., 2015). Os ratos foram divididos em diferentes grupos de 5 animais. A hiperglicemia foi induzida por meio de dose única administrado via intraperitoneal de glicose (4 g/kg; 8,9 M) em todos os grupos. Portanto, os ratos foram divididos nos seguintes grupos: grupo que recebeu apenas a glicose 4 g/kg e veículo (Controle hiperglicêmico). Os grupos tratados receberam os compostos ácido cafeico (25 ou 50 mg/kg) ou teobromina (25 ou 50 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, ácido cafeico e teobromina) e, após 30 min a sobrecarga de glicose foi administrada. Todos os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal. 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.

#### 4.5 Teste de tolerância à emulsão lipídica e concentração de triglicerídeos plasmáticos

A emulsão lipídica foi preparada a partir da mistura de óleo de milho com ácido cólico. Em uma proveta separada o colesterol foi dissolvido em ácido oleico e misturado com o óleo de milho e o ácido cólico. Por fim, a salina foi misturada ao conteúdo total e a emulsão lipídica foi obtida. Os animais foram agrupados e submetidos a um jejum de 16 h, sendo então administrado, por via oral, 1 mL da emulsão lipídica. Ao grupo controle foi administrado a emulsão lipídica e ao grupo tratado foi administrado teobromina na concentração de 50 mg/Kg, 30 min antes de dar emulsão lipídica. Após a administração da emulsão lipídica, amostras de sangue foram coletadas nos tempos 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 h. As amostras obtidas foram centrifugadas a 8000 r.p.m. durante 10 min e no soro foi determinada a concentração de triglicerídeos plasmáticos,

utilizando o kit Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil (KAZMI et al., 2013).

#### 4.6 Determinação da atividade das dissacaridasas intestinais *in vitro*

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). O tratamento foi realizado 5 min antes da incubação com os substratos. 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.

#### 4.7 Atividade do co-transportador de glicose sódio-dependente.

Ratos Wistar foram submetidos à jejum de 16 h, anestesiados com Ketamina/Xilazina (75/10 mg/kg). O intestino então será exposto e o jejuno dividido por ligaduras em 4 segmentos de 4 cm cada um. Então, será adicionado 1 mL da solução de glicose 10 mM no segmento 1, 1 mL da solução do inibidor de SGLT1 (Florizina) 1 mM no segmento 2, 1 mL da solução do composto a ser testado (1 e 10 mM) no segmento 3 e 1 mL da solução de florizina com o composto a ser testado no segmento 4. Após 30 min as soluções foram retiradas e a absorbância medida pela metodologia de glicose oxidase (GONZALEZ-MUJICA, 2003; VARLEY, 1976).

#### 4.8 Isolamento das ilhotas pancreáticas

O pâncreas de ratos euglicêmicos foi visualizado por meio de uma incisão abdominal central. O ducto pancreático foi obstruído na altura do duodeno e canulado próximo ao fígado. O tampão Krebs Ringer (KRb) (contendo 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, carbogenado com O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (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 de 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  $\mu$ L) de ilhotas isoladas foram transferidas para microtubos contendo 300  $\mu$ L de KRb-HEPES livre de colagenase. Após nova centrifugação o tampão foi removido e foi iniciado o ensaio com as ilhotas (KAPPEL et al., 2013c; CASTRO et al., 2014).

#### 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  $\mu$ Ci/mL). Em alguns experimentos, agonistas/inibidores foram adicionados durante os últimos 15 min de incubação. Foram utilizados: Glibenclamida (20  $\mu$ M), diazóxido (250  $\mu$ M), nifedipina (1  $\mu$ M), flunarizina (10 mM), tapsigargina (1  $\mu$ M), dantroleno (50 mM) (BATRA; SJÖGREN, 1983). Após os 60 minutos de incubação com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  as ilhotas foram incubadas por 10 min em tampão KRb-HEPES sem (controle) ou com ácido cafeico (tratado). 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L da amostra foram utilizadas para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951) para normalização (KAPPEL et al., 2013c; CASTRO et al., 2015).

#### 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 tratamentos com ácido cafeico e teobromina 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 Captação de $^{14}\text{C}$ -glicose em músculo sóleo de ratos

Ratos Wistars foram decapitados e o músculo sóleo removido. Após, os mesmos foram transferidos para placa com tampão pH 7,4 e pré-incubados por 30 min com solução tampão KRb-HEPES contendo 5 mM de glicose sem teobromina (controle) e com teobromina (tratado), com agitação a 37 °C em atmosfera de carbogênio ( $\text{O}_2$ :  $\text{CO}_2$ ; 95:5 v/v) em um incubador com agitação do tipo Dubnoff a 37°C. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 60 min em tampão contendo 0,2  $\mu\text{Ci/mL}$  de [ $^{14}\text{C}$ ] DG e, em alguns experimentos, agonistas/inibidores de canais e proteínas das vias de sinalização da insulina foram adicionados. Foram utilizados: Wortmanina (100  $\eta\text{M}$ ), PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ), cicloheximida (0,35 mM), SB239063 (10  $\mu\text{M}$ ), actinomicina D (1  $\mu\text{M}$ ), colchicina (1  $\mu\text{M}$ ), N-etilmaleimida (1mM). Após a incubação os músculos foram homogeneizados em 0,5 N de NaOH e fervidos por 10 min. Aliquotas 25  $\mu\text{L}$  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). Aliquotas de 5  $\mu\text{L}$  da amostra foram utilizadas para quantificação de proteínas pelo método de Lowry (1951) e os resultados foram expressos por meio da relação T/M: com/mL tecido/com/mL de incubação. (CASTRO et al., 2015 ; KAPPEL et al., 2013a; CASTRO et al., 2014; CAZAROLLI et al., 2013).

#### 4.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida e análise de imunotransferência

Os músculos sóleos foram incubados (105 min) na presença ou ausência do tratamento, homogeneizados numa solução de lise contendo 2 mM de EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% (m/v) de SDS e a concentração total de proteína foi determinada. Para a análise de eletroforese, as amostras foram dissolvidas em 25% (v/v) de uma solução contendo 40% de glicerol, 5% de mercaptoetanol, 50 mM de Tris-HCl, pH 6,8 e fervidas durante 3 min. As amostras com concentrações proteicas iguais, foram carregadas em géis de poliacrilamida a 12% e analisadas por SDS-PAGE de acordo com o sistema descontinuo de Laemmli e





grupo 3, tratado apenas com a teobromina 50 mg/Kg e o grupo 4, tratado com teobromina e dexametasona concomitantemente. O cálculo da dose aplicada foi calculada diariamente, de acordo com o peso dos ratos. O grupo controle recebeu o soro fisiológico no qual a dexametasona e a teobromina foram diluídas. Após 24 h da última aplicação da dexametasona, foram realizados o teste de tolerância à insulina (ITT) e o perfil lipídico através da utilização de kits comerciais para triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), LDL-c. As concentrações de HDL-c e VLDL-c foram calculadas pela equação de Friedewald ( $LDL-c = CT - HDL-c - TG/5$ ), onde TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL (RAFACHO et al., 2008).

#### 4.15 Determinação da atividade anti-glicação

Os AGEs foram formados num sistema *in vitro* (adaptado de KIHU 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 (ácido cafeico e teobromina). 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) (KIHU et al., 2004; KAPPEL et al., 2012).

#### 4.16 Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) sérica

A atividade da enzima LDH foi determinada aos 210 min após o tratamento de acordo com instruções do fabricante (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil) (CASTRO et al., 2014).

#### 4.17 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M., conforme número de amostras especificadas nas legendas dos gráficos. As comparações entre os grupos 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 significativas para um  $p \leq 0,05$ .



## 5. RESULTADOS

5.1 Resultados Parte 1 – Efeito de compostos selecionados na homeostasia da glicose.

5.1.1 Efeito de compostos naturais isolados na absorção intestinal de glicose através de um ensaio *in situ*.

Foi realizado um estudo *in situ* para avaliar o efeito destes compostos tendo o SGLT-1 como possível alvo de ação dos mesmos. A figura 9 representa uma curva de tempo, a qual mostrou que em 30 min houve a maior absorção intestinal de glicose, enquanto que a figura 10 mostra a absorção da glicose em dois tempos (15 e 30 min) com e sem a utilização de 1 mM de florizina, um bloqueador do SGLT-1, que quando é adicionado, diminui a absorção da glicose. Baseado nos resultados supracitados o tempo de 30 min foi escolhido para os experimentos posteriores.

A figura 11 apresenta ação do ácido cafeico na absorção intestinal de glicose. Quando utilizado isoladamente, o ácido cafeico diminuiu a absorção de glicose intestinal nas doses de 1 e 10 mM e, quando tratado com a florizina na dose de 1 mM, o efeito bloqueador foi ainda maior.

O efeito da catequina na absorção intestinal de glicose também foi estudado. Na concentração de 1 mM, o composto sozinho não apresentou diminuição na absorção de glicose, no entanto, quando administradas catequina e florizina houve diminuição na absorção, semelhante à florizina administrada isoladamente. Enquanto isso, na concentração de 10 mM, a catequina isolada apresentou diminuição na absorção intestinal de glicose e juntamente com a florizina este efeito inibidor foi potenciado e a diminuição da absorção foi ainda maior, sendo menor que a florizina (figura 12).

A miricitrina, assim como a catequina, não apresentou diminuição na absorção de glicose quando administrada sozinha, na dose de 1 mM, mas a administração concomitantemente da florizina, resultou na redução significativa da absorção de glicose. Porém na dose de 10 mM a miricitrina *per se* apresentou uma redução da absorção intestinal de glicose acentuada em relação a florizina, assim como na administração concomitante de ambas. (Figura 13).

Na figura 14, observa-se o efeito da quercetina, que na concentração de 1 mM, apresentou um perfil semelhante à miricitrina e à catequina nas mesmas concentrações. No entanto, na concentração de 10 mM, o efeito da quercetina sozinha, ou na presença de florizina, foi semelhante ao efeito conhecido da florizina.

O efeito da naringenina (figura 15), na concentração de 1 mM não mostrou uma redução significativa na absorção intestinal de glicose, mesmo quando administrada juntamente com a florizina. No entanto, na concentração de 10 mM a naringenina foi capaz de reduzir a absorção de glicose tanto sozinha quanto quando adicionada junto com a florizina.

Rutina, fukugetina, hispidulina e ácido clorogênico ambos não apresentaram efeito *per se* na redução da absorção de glicose no intestino, porém quando administradas concomitantemente com a florizina, apenas rutina e fukugetina parecem prejudicar o efeito inibitório da florizina, demonstrando assim que esses dois compostos podem estar competindo com a florizina pelo sítio de ligação. Hispidulina e ácido clorogênico apresentaram uma diminuição igual à da florizina, sendo assim, parecem não ter ação na inibição do SGLT1 (Figuras 16A, 16B, 16C e 16D).

Figura 9 - Curva de tempo na absorção intestinal de glicose.

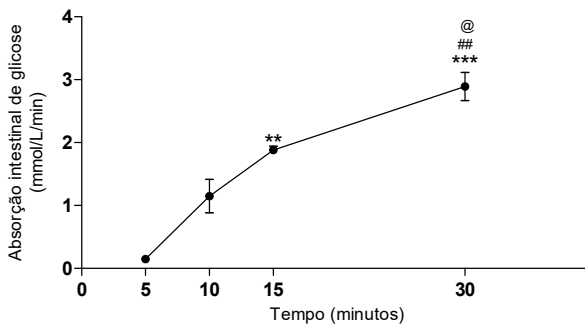


Figura 9 – Curva de tempo na absorção intestinal de glicose através um modelo experimental *in situ*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 4 para cada tratamento. \*\* $P \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao tempo de 5 min; ## $p \leq 0,01$  comparado ao tempo de 10 min @ $p \leq 0,05$  comparado ao tempo de 15 min.

Figura 10 - Efeito da florizina na absorção intestinal de glicose.

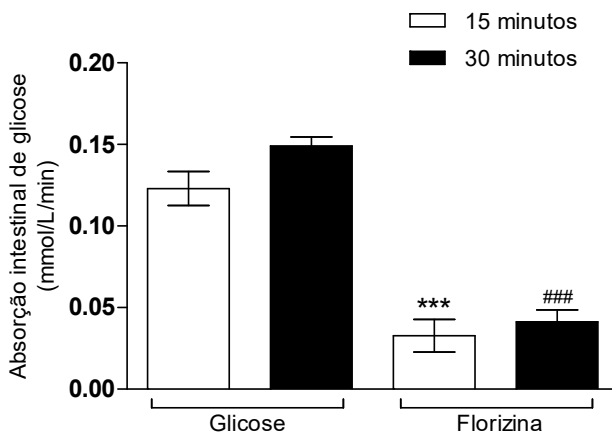


Figura 10 – Efeito de 1 mM de florizina na absorção intestinal de glicose através um modelo experimental *in situ*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=4$  para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$  comparado ao tempo de 15 min; ### $p \leq 0,001$  comparado ao tempo de 30 min.

Figura 11 - Efeito do ácido cafeico na absorção intestinal de glicose.

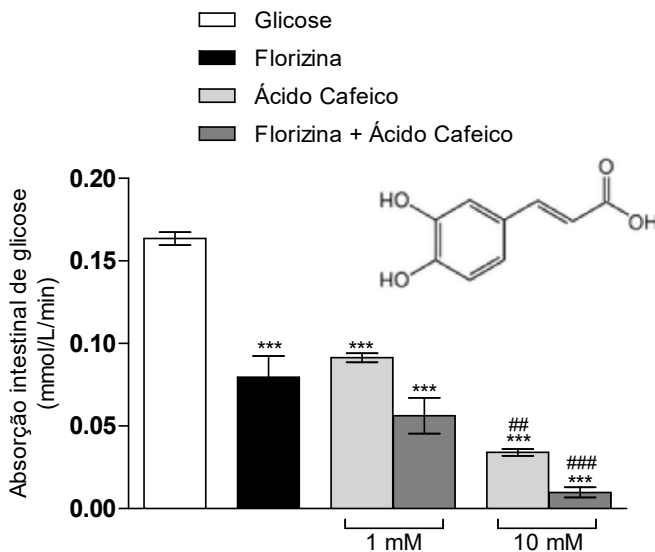


Figura 11 – Efeito de 1 e 10 mM de ácido cafeico na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=4$  para cada tratamento.  $***P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle;  $##p \leq 0,01$ ;  $###p \leq 0,001$  comparado com a florizina.

Figura 12 - Efeito da catequina na absorção intestinal de glicose.

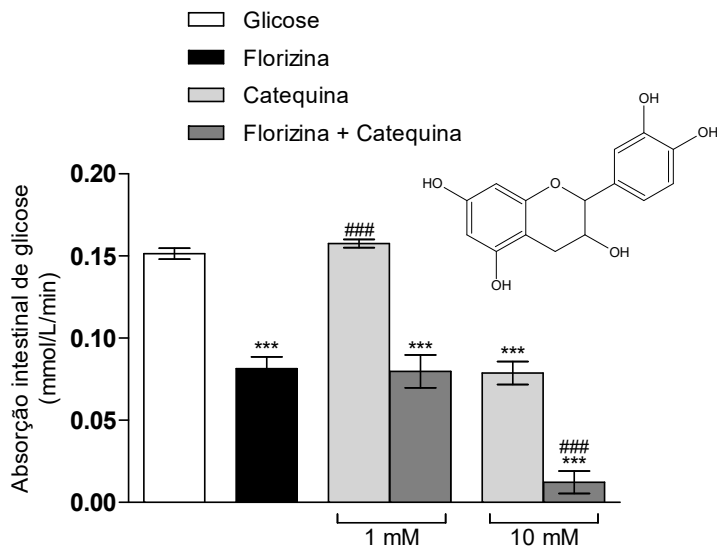


Figura 12 – Efeito de 1 e 10 mM de catequina na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=4$  para cada tratamento.  $***P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle;  $###p \leq 0,001$  comparado com a florizina.

Figura 13 - Efeito da miricitrina na absorção intestinal de glicose.

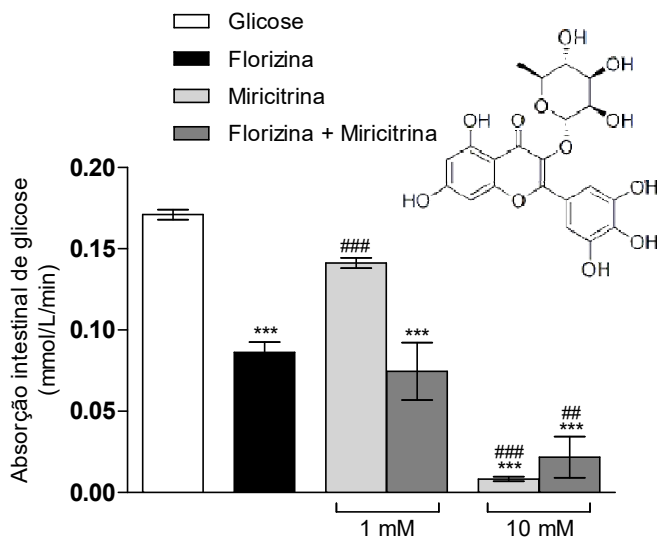


Figura 13 – Efeito de 1 e 10 mM de miricitrina na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 4 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle; ## $p \leq 0,01$ ; ### $p \leq 0,001$  comparado com a florizina.



Figura 14 - Efeito da quercetina na absorção intestinal de glicose.

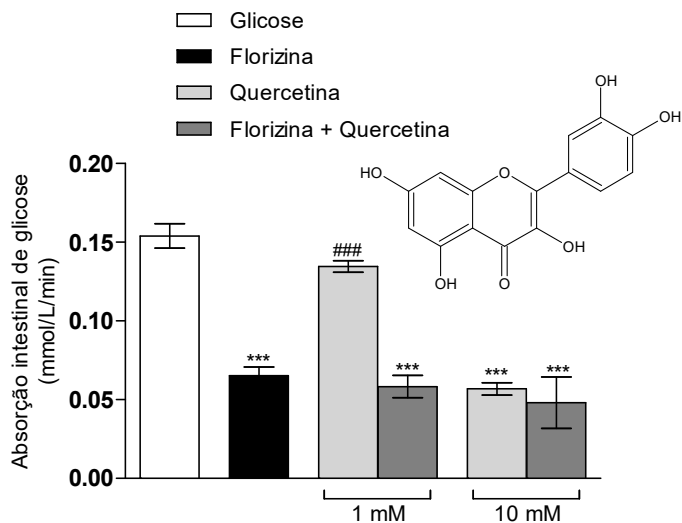


Figura 14 – Efeito de 1 e 10 mM de quercetina na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 4 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*  $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle; ### $p \leq 0,001$  comparado com a florizina.

Figura 15 - Efeito da naringenina na absorção intestinal de glicose.

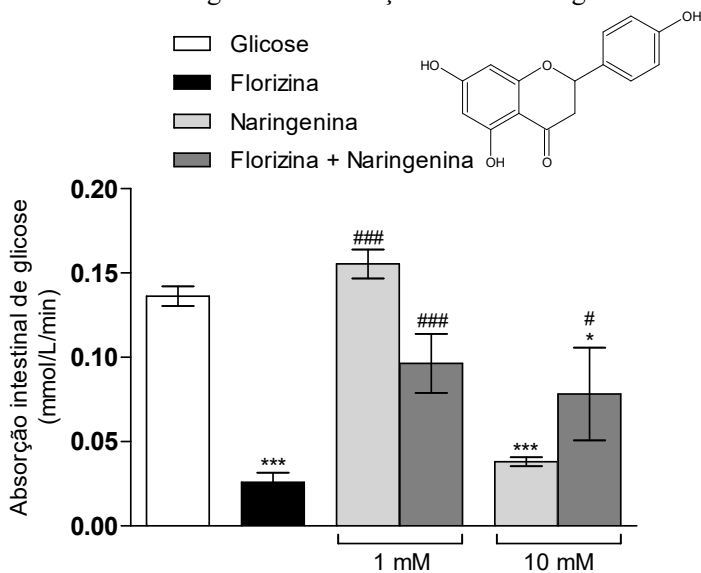


Figura 15 – Efeito de 1 e 10 mM de naringenina na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=4$  para cada tratamento. \* $P \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ ; ### $p \leq 0,001$  comparado com a florizina.

Figura 16 - Efeito da rutina, fukugetina, hispídulina e ácido clorogênico na absorção intestinal de glicose.

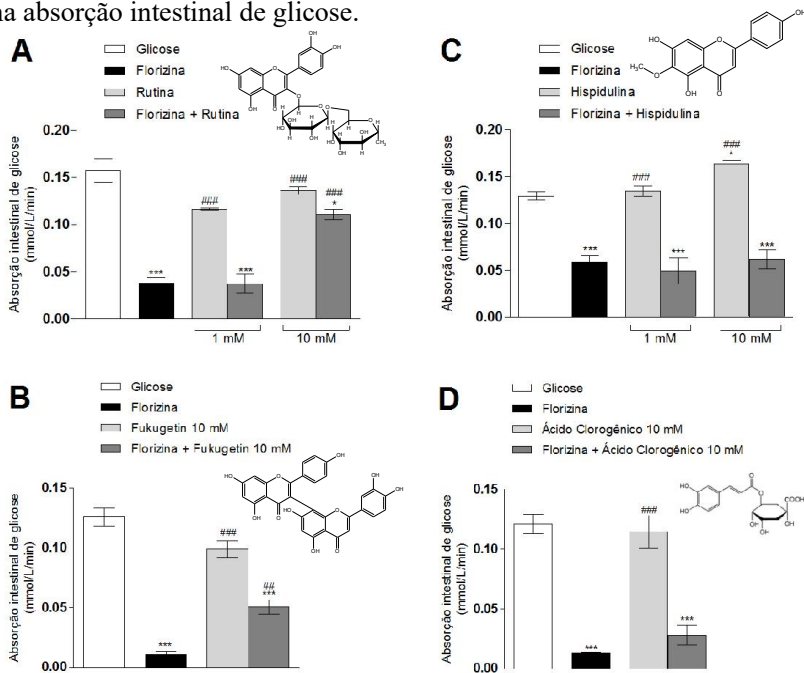


Figura 16 – Efeito de 1 e 10 mM de rutina (A), 10 mM de fukugetina (B), 1 e 10 mM de hispídulina (C) e 10 mM de ácido clorogênico (D) na absorção intestinal de glicose durante 30 minutos através um modelo experimental *in situ* utilizando 1 mM de florizina como controle positivo da inibição da absorção intestinal de glicose. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=4$  para cada tratamento. \* $P \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao grupo controle; ### $p \leq 0,01$ ; #### $p \leq 0,001$  comparado com a florizina.

## 5.2 Resultados Parte 2 – Ação secretagoga de insulina do ácido cafeico.

### 5.2.1 Efeito do ácido cafeico na curva de tolerância à glicose e na atividade das dissacaridasas intestinais.

A Figura 17 apresenta os resultados obtidos em animais tratados com ácido cafeico na concentração de 25 e 50 mg/kg. Observou-se uma redução na glicemia de aproximadamente 25 % nos tempos nos 15 e 30 min comparado com o controle na dose de 50 mg/Kg. Esta atividade perdurou até o tempo 60, no qual a redução glicêmica atingiu 16%. Com

o objetivo de investigar o mecanismo envolvido na atividade antihiperlicêmica do ácido cafeico, sequencialmente foi avaliada a atividade das dissacaridasas intestinais. Como mostra a Figura 18, assim como a acarbose, o ácido cafeico pode estar inibindo a atividade das dissacaridasas maltase e sacarase, mediante tratamento *in vitro*. Esses efeitos não foram observados na atividade da enzima lactase.

Figura 17 - Efeito agudo do ácido cafeico na curva de tolerância a glicose.

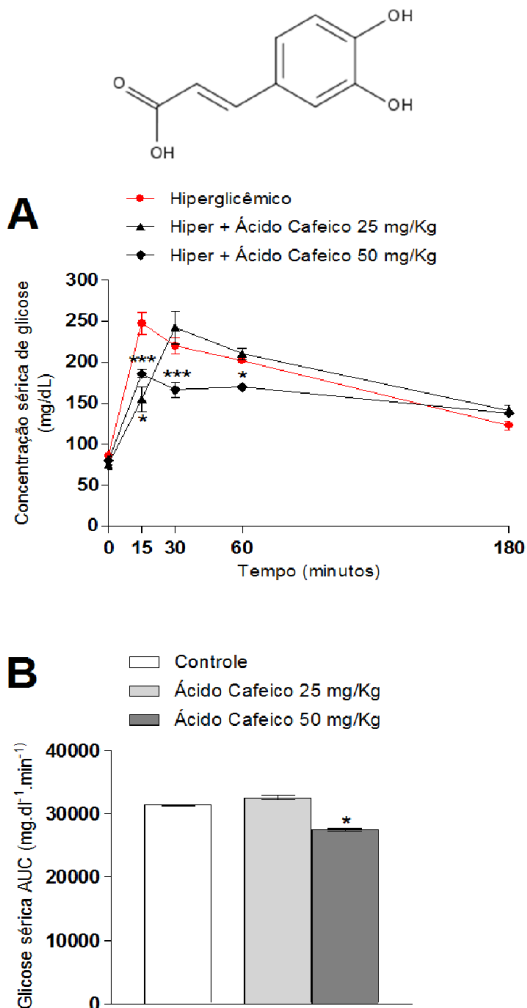


Figura 17 – Efeito agudo na concentração sérica de glicose em ratos tratados com 50 mg/Kg de ácido cafeico *in vivo* (A) e na respectiva área sob a curva (AUC) (B) através de um modelo experimental *in vivo* com animais em estado hiperglicêmico. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 5 para cada tratamento. \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.

Figura 18 - Efeito do ácido cafeico na atividade de dissacaridasas intestinais maltase (figura 18 A) sacarase (figura 18 B) e lactase (figura 18 C).

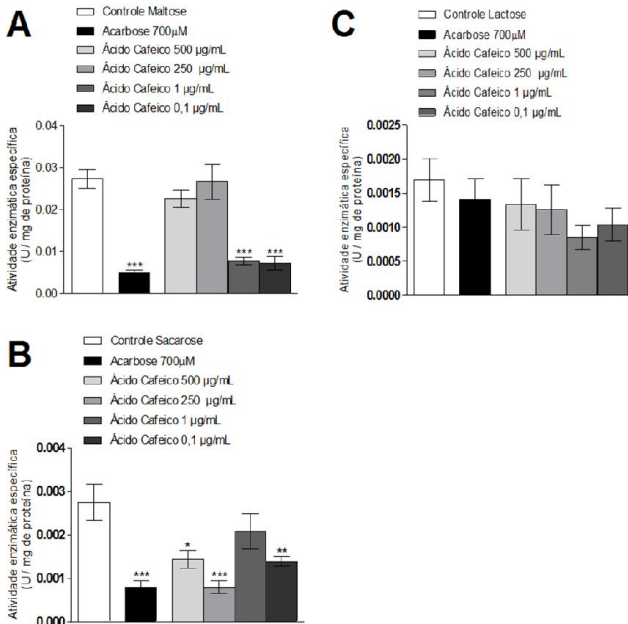


Figura 18 - Atividade das dissacaridasas intestinais em um estudo *in vitro*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 5 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$  comprado ao grupo controle.

5.2.2 Envolvimento do ácido cafeico no influxo de cálcio ( $^{45}\text{Ca}^{2+}$ ) em ilhotas pancreáticas.

O aumento de cálcio intracelular está intimamente associado com a excitose das vesículas de insulina das células  $\beta$ -pancreáticas. Após uma incubação de 60 min com  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , 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 ácido cafeico. Dessa forma, buscando investigar a influência do ácido cafeico

na secreção de insulina, o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas foi avaliado nas concentrações de 50  $\eta$ M, 50  $\rho$ M, 50 fM e 50 aM. Como mostra a Figura 19 A, o ácido cafeico aumentou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas nas concentrações de 50  $\rho$ M e 50 fM em torno de 58% e 50%, respectivamente. Além disto, a Figura 19 B representa o aumento significativo do influxo de cálcio (cerca de 13%) após 10 min de incubação. Este efeito em 10 min de incubação comparando com 30 min mostrou ter uma tendência a ser elevado. Esse aumento de influxo de cálcio em 10 min corrobora a primeira fase de secreção de insulina. Portanto, sugere-se que o ácido cafeico tenha um efeito pronunciado nesta primeira fase. Dessa forma, os estudos seguintes foram conduzidos no tempo de 10 min a fim de avaliar a ação do ácido cafeico na primeira fase secretória. E a concentração selecionada do composto foi a de 50  $\rho$ M.

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

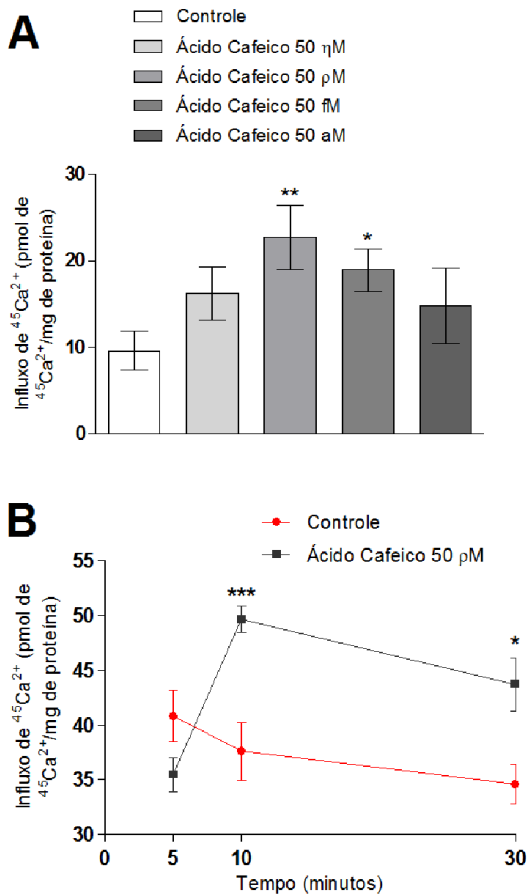


Figura 19 - Curva dose-resposta (A) e curva de tempo de influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  do ácido cafeico *in vitro* (B). Pré-incubação= 60 min; Incubação= 10 min (A) e incubação= 0 a 30 min (B). Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6. \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ , comparado ao grupo controle.

### 5.2.3 Investigação da modulação do ácido cafeico em canais de potássio dependentes de ATP ( $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ ) em ilhotas pancreáticas.

Tendo como objetivo investigar o provável mecanismo de ação do ácido cafeico na secreção de insulina, mediada pelo influxo de cálcio e se esse mecanismo ocorre via canal  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$ , as ilhotas pancreáticas foram incubadas com glibenclamida (20  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de canais  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  e

diazóxido (250  $\mu\text{M}$ ) um ativador de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  devido à sua ligação ao domínio SUR1 do canal. Como pode ser observado na figura 20 A, o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  foi igual nos grupos ácido cafeico, glibenclamida e aquele onde o composto foi incubado juntamente com a glibenclamida e todos diferentes do grupo controle. A figura 20 B representa a incubação com diazóxido e se observa que o ácido cafeico aumentou o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  tanto *per se*, quanto quando foi incubado juntamente com o diazóxido. Ou seja, o diazóxido, assim como a glibenclamida, não alteraram a resposta estimulatória do ácido cafeico no influxo de cálcio.



Figura 20 - Modulação do ácido cafeico nos canais de potássio dependentes de ATP em ilhotas pancreáticas.

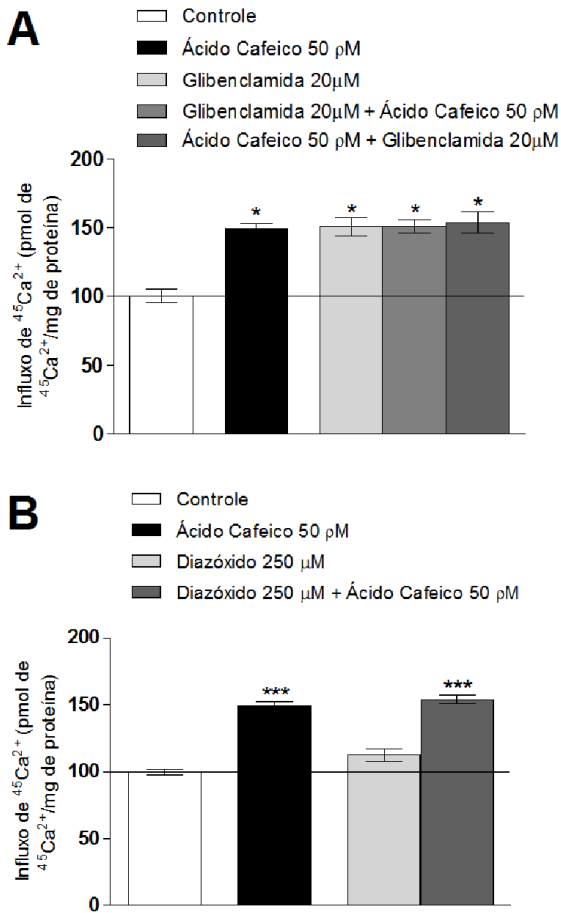


Figura 20 – Envolvimento dos canais de potássio no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* quando incubado com glibenclamida (20 µM) (A) e diazóxido (250 µM) (B) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n=6. \* $P \leq 0,05$  e \*\*\* $p \leq 0,001$  comparado ao grupo controle.

5.2.4 Investigação do envolvimento da modulação de canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC-L e VDCC-T) em ilhotas pancreáticas no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

O envolvimento do cálcio na secreção de insulina está bem estabelecido. Dessa forma, para avaliar um possível efeito do ácido cafeico na modulação dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L e T, as amostras foram incubadas com bloqueadores já conhecidos desses canais, nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ), bloqueador de VDCC-L e flunarizina (10 mM), bloqueador de VDCC-T. A figura 21 mostra que na presença da nifedipina e flunarizina, respectivamente, não há alteração no influxo basal de cálcio. No entanto, a nifedipina bloqueou significativamente o influxo de cálcio mediado por ácido cafeico, mas o mesmo não ocorreu com a flunarizina (Figura 21).

Figura 21 - Envolvimento do ácido cafeico nos canais de cálcio dependentes de voltagem em ilhotas pancreáticas.

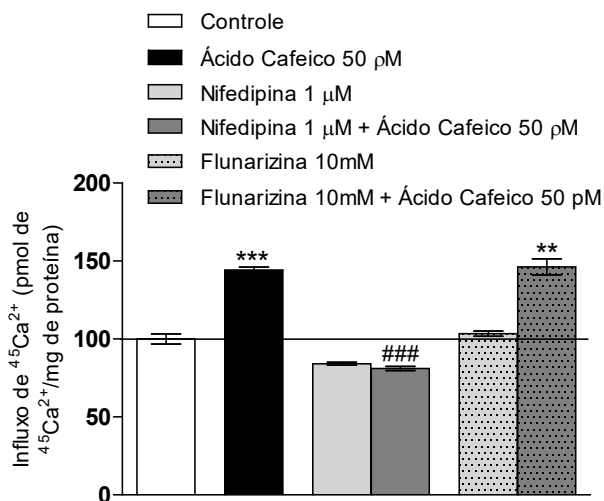


Figura 21 - Envolvimento dos canais de cálcio no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* quando incubado com nifedipina (1  $\mu\text{M}$ ) e flunarizina (10 mM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\*  $p \leq 0,01$

comparado ao grupo controle; ### $p \leq 0,001$  comparado ao grupo ácido cafeico 50  $\mu\text{M}$ .

### 5.2.5 Estudo do envolvimento da mobilização do cálcio intracelular em ilhotas pancreáticas, no efeito estimulatório do ácido cafeico no aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

Buscando entender o papel do ácido cafeico no aumento do influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ , foi investigado a ação do composto na mobilização de cálcio intracelular. Para tanto, foram utilizados bloqueadores de canais de cálcio presentes no retículo endoplasmático (RE), tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ), inibidor da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase - SERCA), responsável por bombear o cálcio para dentro do retículo quando a concentração do mesmo se encontra reduzida no interior do RE, além disso, foi utilizado também dantroleno (50 mM), bloqueador do receptor de rianodina, responsável pela ativação e liberação do cálcio advindo de estoques do RE para o citosol da célula. Tanto na presença de dantroleno quanto da tapsigargina, nas concentrações utilizadas, não observamos alteração na concentração basal de cálcio, no entanto o efeito estimulatório do ácido cafeico foi suprimido (Figura 22).

Figura 22 - Envolvimento da mobilização do cálcio intracelular em ilhotas pancreáticas, no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

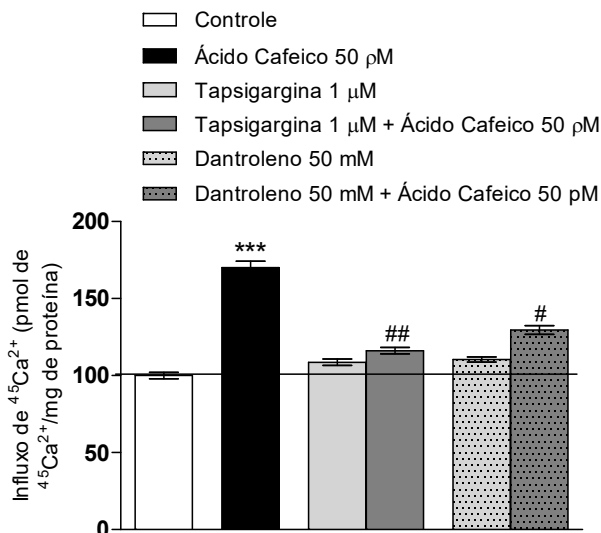


Figura 22 - Envolvimento da mobilização do cálcio intracelular no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* quando incubado com tapsigargina (1  $\mu\text{M}$ ) dantroleno (50 mM) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$  comparado ao grupo ácido cafeico 50  $\rho\text{M}$ .

### 5.2.6 Influência das proteínas cinases A e C no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ em ilhotas pancreáticas.

A fim de compreender o papel das proteínas cinases A e C, PKA e PKC, respectivamente, no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de cálcio, as ilhotas foram incubadas com H89 (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da proteína cinase A, uma proteína cinase dependente de AMP-cíclico e RO31-0432 (50  $\mu\text{M}$ ), inibidor da PKC, ativada pelo aumento nas concentrações de cálcio. Quando o ácido cafeico foi incubado com os inibidores, mostrado na figura 23, não houve interferência dos inibidores na ação estimulatória do composto, demonstrando assim que o efeito do

ácido cafeico no aumento do influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, parece não ter diretamente a participação nem da PKA e nem da PKC.

Figura 23 - Influência das proteínas cinases A e C no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ .

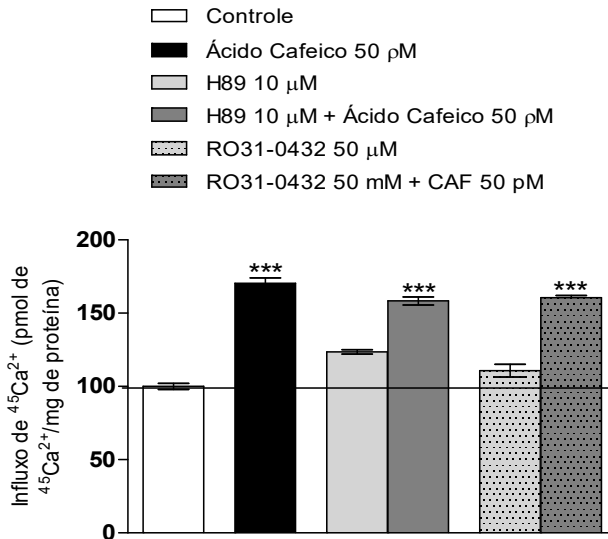


Figura 23 - Envolvimento das proteínas cinases A e C no efeito estimulatório do ácido cafeico no influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* quando incubado com H89 (10  $\mu\text{M}$ ) RO31-0432 (50  $\mu\text{M}$ ) presentes durante 15 min da pré-incubação e durante a incubação. Pré-incubação= 60 min; incubação= 10 min. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle.

5.2.7 Efeito do ácido cafeico no conteúdo total de glicogênio hepático e muscular.

Buscando verificar se o ácido cafeico poderia estar diminuindo a glicemia por outras vias, além da secreção de insulina e inibição da absorção intestinal de glicose, foi avaliado o efeito do mesmo no conteúdo de glicogênio hepático e muscular e, como observado na Figura 24, não houve alterações significativas no conteúdo de glicogênio hepático e muscular nas concentrações e tempo avaliado, quando comparado ao grupo controle.

Figura 24 - Efeito agudo do ácido cafeico no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

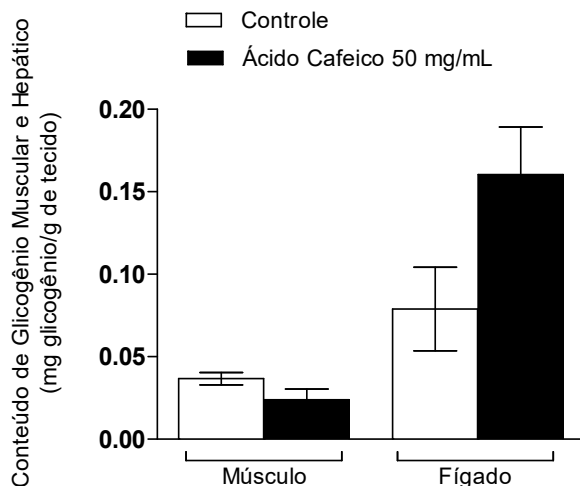


Figura 24 - Conteúdo total de glicogênio muscular e hepático em ratos tratados com 50 mg/Kg de ácido cafeico *in vivo*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 5 para cada tratamento.

### 5.2.8 Efeito do ácido cafeico na formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).

A figura 25 apresenta a ação do ácido cafeico na redução da formação de AGEs, através de ensaio *in vitro*. No momento da incubação inicial (dia 0) apenas a fluorescência intrínseca da albumina foi observada, não havendo diferenças entre os grupos (Figura 25 A).

A característica de emissão de fluorescência dos AGEs permite que a formação destes produtos seja observada após determinado período de incubação. Foram incubadas juntas a albumina, na presença ou ausência de glicose/frutose na presença ou ausência do tratamento em 37° sob agitação durante 28 dias. Decorridos 7 dias de incubação, observou-se a formação dos AGEs, uma vez que, houve um aumento significativo da fluorescência emitida pelo grupo albumina mais glicose ou frutose, quando comparada com a albumina incubada isoladamente (Figura 25 B). Durante o mesmo período, o ácido cafeico não apresentou efeitos na formação dos AGEs, quando comparado ao grupo albumina glicada

(albumina incubada com glicose ou frutose) (Figuras 25 B). Mas, com 14 dias de incubação o ácido cafeico diminuiu a intensidade de fluorescência quando incubado com a glicose, na concentração de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e aumentou a glicação com frutose. (Figura 25 C) Porém, após 28 dias de incubação, o efeito na glicação com frutose foi significativamente menor na dose de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto que na glicação com glicose o efeito permaneceu o mesmo observado em 14 dias (Figura 25 D).

Figura 25 - Efeito da ácido cafeico na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

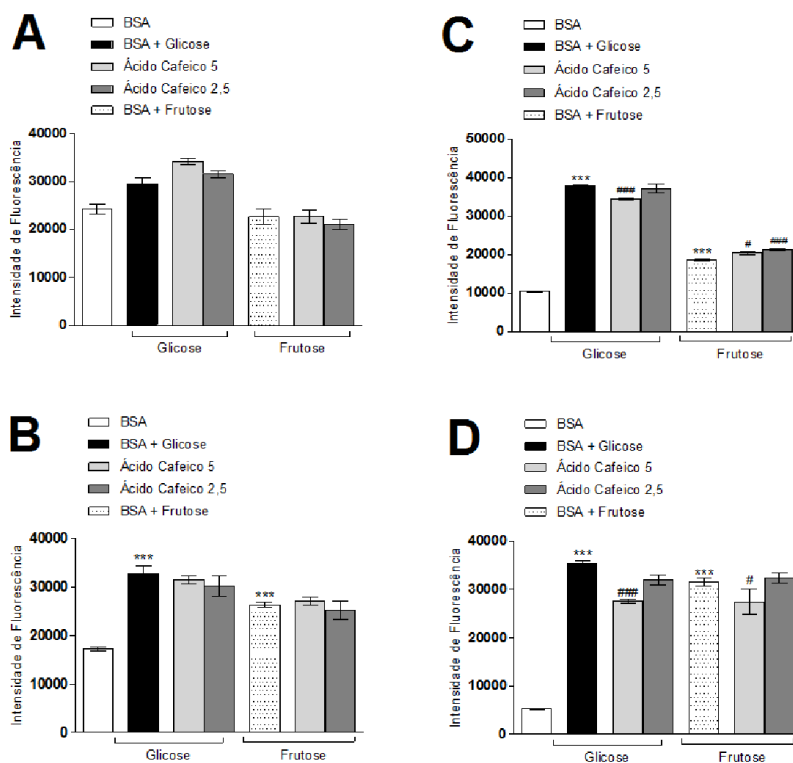


Figura 25 – Efeito do ácido cafeico na formação de AGEs no modelo BSA/glicose ou frutose *in vitro* através da medida de intensidade de fluorescência no dia 0 (A), em 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). Nas concentrações de 5 e 2,5 mg/mL. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6. \*\*\* $P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ ; ### $p \leq 0,001$  comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

### 5.2.9 Efeito do ácido cafeico na atividade da LDH sérica.

Com a finalidade de investigar se o composto apresenta toxicidade tecidual foi avaliada a atividade da enzima lactato desidrogenase. A figura 26 mostra que, 180 min após o tratamento *in vivo* com ácido cafeico não houve alterações na atividade da enzima LDH, sugerindo que este composto não seria tóxico, neste modelo experimental.

Figura 26 - Efeito do ácido cafeico na atividade da LDH sérica.

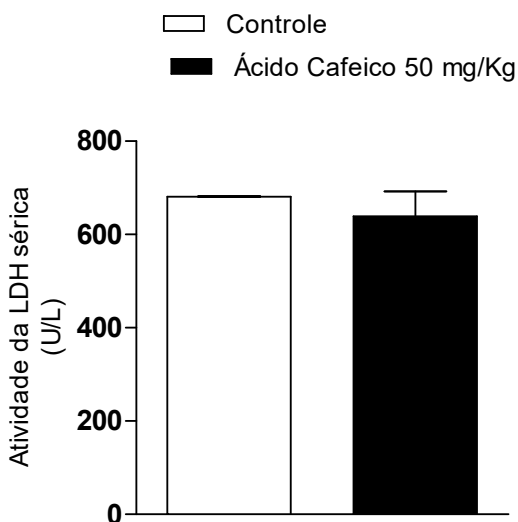


Figura 26 - Efeito agudo do ácido cafeico na atividade da lactato desidrogenase sérica *in vivo*. Valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com n= 5 para cada grupo.

## 5.3 Resultados Parte 3 – Efeito insulinomimético da teobromina no músculo sóleo.

### 5.3.1 Efeito da teobromina na curva de tolerância à glicose, na atividade das dissacaridasas intestinais e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

A Figura 27 A e B apresenta o efeito agudo da teobromina nas doses de 25 e 50 mg/Kg na concentração glicêmica. Após a realização da curva de dose, nota-se uma redução significativa na concentração sérica de glicose nos tempos 15 e 30 min (em torno de 19% e 16%,



respectivamente), resultante do tratamento com 50 mg/kg da teobromina, quando comparado com o grupo controle.

Figura 27 - Efeito agudo da teobromina na curva de tolerância a glicose.

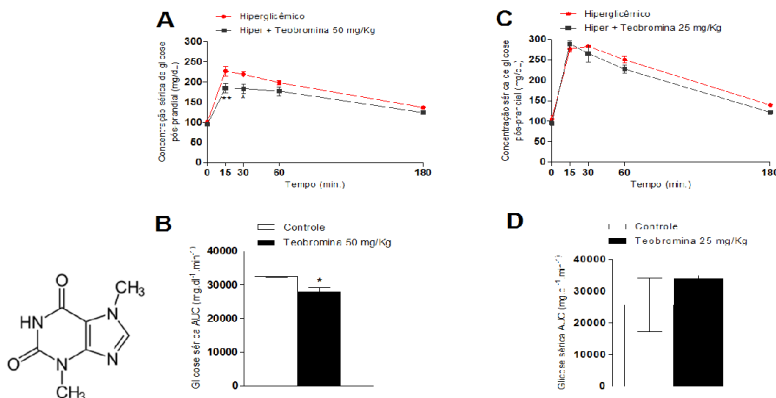


Figura 27 – Efeito agudo na concentração sérica de glicose em ratos tratados com 50 mg/kg de teobromina *in vivo* (A) e a respectiva área sob a curva (AUC) (B); Concentração sérica de glicose em ratos tratados com 25 mg/Kg de teobromina (C) e a respectiva área sob a curva (AUC) (D). Os valores são expressos como média ± E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \* $P \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$  comparado ao grupo controle.

### 5.3.2 Efeito da teobromina no teste de tolerância à emulsão lipídica.

Para avaliar a ação da teobromina na concentração sérica de triglicerídeos, foi realizado o teste de tolerância à emulsão lipídica. O grupo tratado com teobromina apresentou uma diminuição significativa na concentração sérica de triglicerídeos, como mostrado na Figura 28.

Figura 28 - Efeito da teobromina na concentração sérica de triglicerídeos.

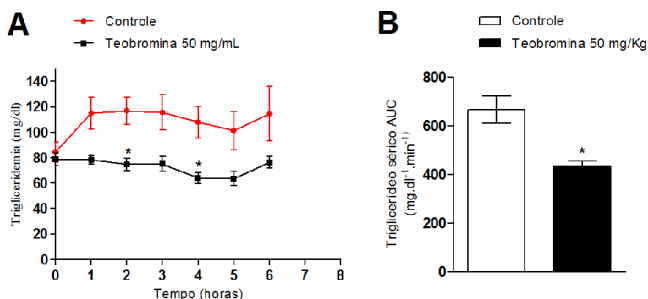


Figura 28 - Concentração sérica de triglicerídeos em ratos tratados com 50 mg/Kg de teobromina *in vivo* (A) e a respectiva área sob a curva (AUC) (B). Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n= 5$  para cada tratamento.  $*P \leq 0,05$  comparado ao grupo controle.

5.3.3 Efeito da teobromina na atividade das dissacaridasas intestinais e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

Com o intuito de investigar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antihiperglicêmica deste composto, o conteúdo de glicogênio hepático e muscular e a atividade de dissacaridasas intestinais foram determinados. Como observado na Figura 29, houve aumento significativo no conteúdo de glicogênio hepático e muscular na concentração e tempo avaliados, quando comparado ao grupo controle. No entanto, a Figura 30 mostra que não houve diferenças significativas do tratamento *in vitro* com teobromina na atividade das dissacaridasas intestinais maltase, sacarase e lactase, quando comparado ao controle.

Figura 29 - Efeito agudo da teobromina no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

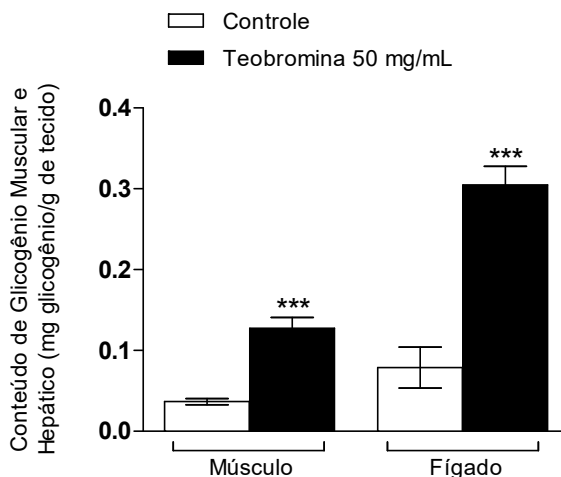


Figura 29 - Conteúdo total de glicogênio muscular e hepático em ratos tratados com 50 mg/kg de teobromina em um modelo experimental *in vivo*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n= 6$  para cada tratamento.  $***P \leq 0,001$  comprado ao grupo controle.

Figura 30 - Efeito da teobromina na atividade de dissacaridases intestinais maltase (figura 31 A) sacarase (figura 31 B) e lactase (figura 31 C).

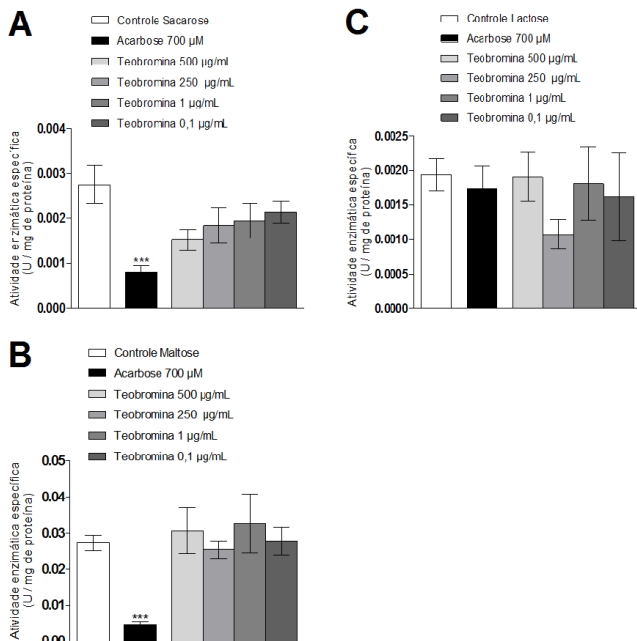


Figura 30 – Efeito da teobromina na atividade das dissacaridases intestinais *in vitro*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$  comprado ao grupo controle.

#### 5.3.4 Efeito da teobromina na captação de glicose no músculo sóleo.

A fim de investigar o aumento do glicogênio muscular, uma curva dose resposta para teobromina foi realizada através do ensaio *in vitro* na captação de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose ( $^{14}\text{C}$ -DG) no músculo sóleo. A figura 31 mostra o efeito da teobromina nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$ , 50  $\eta\text{M}$  e 50  $\rho\text{M}$  na captação de glicose após 1 h de incubação. O efeito estimulatório da teobromina na captação de  $^{14}\text{C}$ -DG representou 22% na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e 32% em 50  $\eta\text{M}$  na captação de glicose quando comparada ao grupo controle.

Figura 31 - Efeito da teobromina na captação *in vitro* de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose no músculo sóleo.

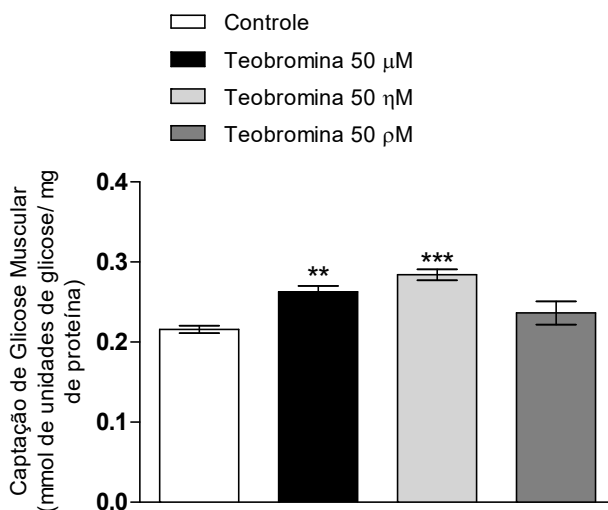


Figura 31 - Captação de  $^{14}\text{C}$ -Deoxi-Glicose em músculo sóleo com e sem tratamento com teobromina em um estudo *in vitro*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=5$  para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ ; \*\* $p \leq 0,01$  comprado ao grupo controle.

### 5.3.5 Investigação do mecanismo da teobromina na translocação e fusão do GLUT4 no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica.

Apoiado no aumento da captação de glicose no músculo sóleo causado pela teobromina, foi investigado o mecanismo de ação pelo qual o composto poderia estar atuando, através da utilização de alguns inibidores de proteínas-alvo da sinalização intracelular da insulina no músculo.

Dessa forma, os efeitos da teobromina na ativação da PI3K e envolvimento na translocação e fusão das vesículas foram investigados através da utilização de wortmanina (100 nM), um inibidor específico da PI3K, N-etilmaleimida (1 mM), um agente alquilante que inibe eventos de tráfico vesicular na membrana e colchicina (1  $\mu\text{M}$ ), um agente despolimerizante de microtúbulos. A estimulação da captação de glicose muscular pela teobromina foi inibida, não sendo diferente do controle, quando realizado o pré-tratamento com os inibidores wortmanina, N-etilmaleimida e colchicina (Figura 32).

Figura 32 - Efeito da teobromina na captação *in vitro* de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica.

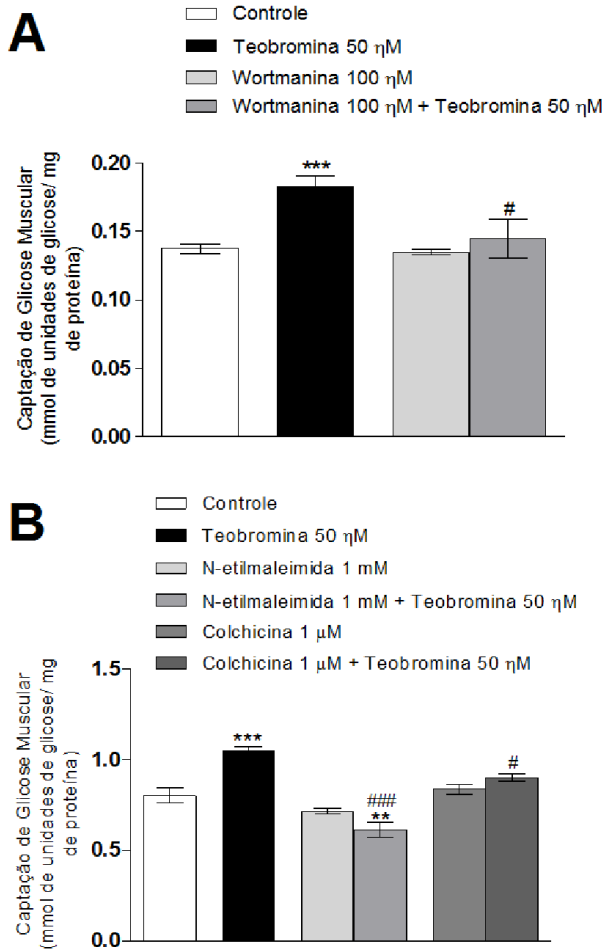


Figura 32 - Efeito da teobromina na captação de *in vitro* de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose e o envolvimento de PI3K (A), microtúbulos e tráfico vesicular na membrana (B). Amostras submetidas à 30 min de pré-incubação e 60 min de incubação. Valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com  $n=6$ . Valores significativos em  $**p < 0.01$  e  $***p < 0.001$  quando comparado ao grupo basal. Resultados significativos em  $\#p < 0.05$  e  $###p < 0.001$  quando comparado ao grupo tratado com teobromina.

5.3.6 Investigação do efeito da teobromina na transcrição gênica e síntese de proteínas no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica.

Com o intuito de investigar se a teobromina poderia aumentar a captação de glicose através síntese proteica ou atividade nuclear, foi investigada a transcrição celular, a cascata das MAPKs e tradução de proteínas. A via das MAPKs, é responsável por várias atividades celulares. Para avaliar a ação da teobromina nessa via PD98059 (50  $\mu\text{M}$ ), um inibidor da via das MAPKs, foi utilizado. Enquanto que para estudar se o efeito da teobromina na estimulação da captação de glicose muscular poderia ocorrer através da síntese de proteínas ou da transcrição celular, cicloheximida (0,35 mM), um inibidor da síntese *de novo* de proteínas e actinomicina D (1  $\mu\text{M}$ ), inibidor da transcrição nuclear foram utilizados.

O aumento da captação de glicose estimulado pelo tratamento com a teobromina foi inibido após o pré-tratamento com PD98059 e cicloheximida (Figura 33 A), no entanto, não houve diferença na captação de glicose entre o grupo tratado com teobromina e o grupo tratado com a teobromina na presença da actinomicina D, demonstrando que possivelmente a teobromina tem um envolvimento na síntese proteica de GLUT4, porém não envolvendo eventos nucleares (Figura 33 B).

Figura 33 - Efeito da teobromina na captação *in vitro* de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica.

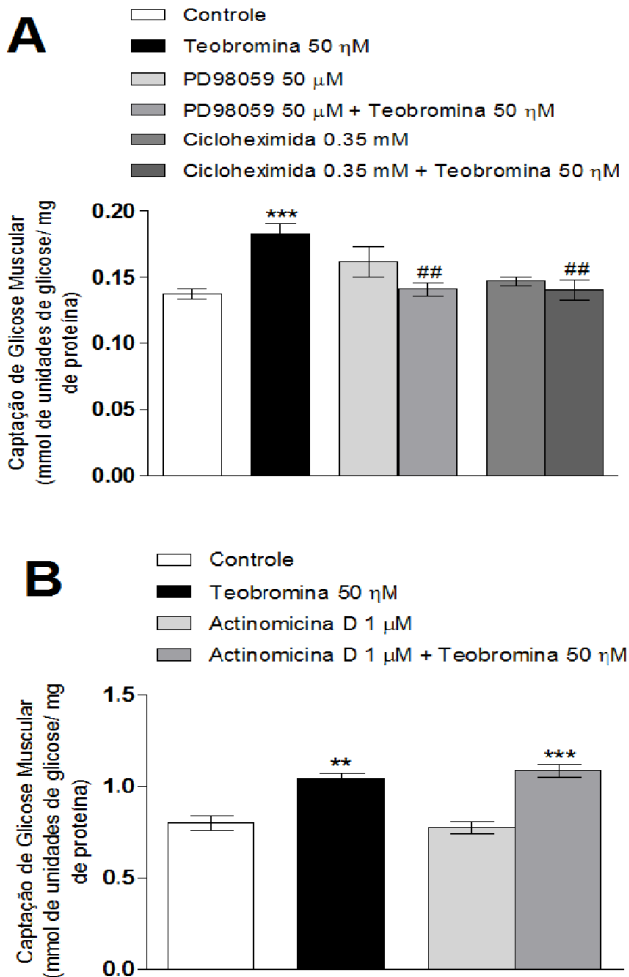


Figura 33 - Efeito da teobromina na captação de *in vitro* de  $^{14}\text{C}$ -deoxi-glicose e o envolvimento da MEK, síntese proteica (A) e transcrição nuclear (B). Amostras submetidas à 30 min de pré-incubação e 60 min de incubação. Valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com  $n=6$  em triplicata para cada grupo. Valor significativo em  $**p < 0.01$  e  $***p < 0.001$  quando comparado ao grupo basal. Resultados significativos em  $##p < 0.01$  quando comparado ao grupo tratado com teobromina.

### 5.3.7 Investigação do efeito da teobromina na ativação do GLUT4 no músculo sóleo através da utilização de inibidores das vias de sinalização insulínica.

Para investigar a ação da teobromina na estimulação da captação de glicose muscular por via independente, mas complementar, a via da PI3K, como a via da p38 MAPK, provavelmente envolvida no estado de fosforilação e ativação do GLUT4 na membrana plasmática do músculo sóleo (FURTADO et al., 2003, CAZAROLLI et al., 2013; TREMBLAY et al., 2003) foi utilizado SB239063 (10 $\mu$ M), um inibidor da p38. Como observado na figura 34, após o pré-tratamento com SB239063, a estimulação da captação de glicose causada pela teobromina foi inibida pelo tratamento com SB239063.

Figura 34 - Efeito da teobromina na captação *in vitro* de <sup>14</sup>C-deoxi-glicose muscular através da utilização de inibidores da via insulínica.

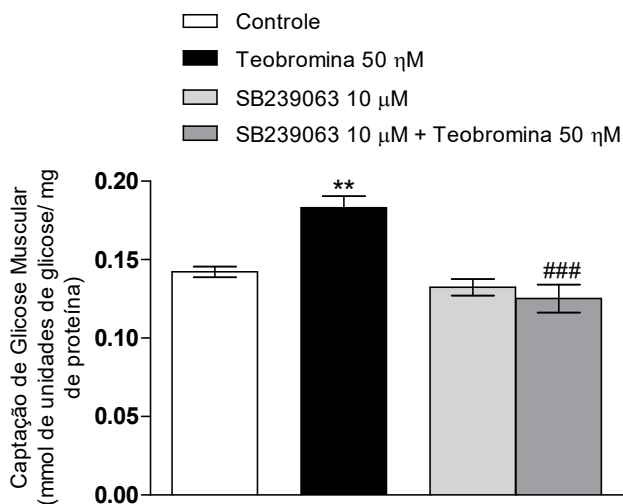


Figura 34 - Efeito da teobromina na captação de *in vitro* de <sup>14</sup>C-deoxi-glicose e o envolvimento da p38. Amostras submetidas à 30 min de pré-incubação e 60 min de incubação. Valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com n= 6 em triplicata para cada grupo. Valores significativos em \*\*p< 0.01 quando comparado ao grupo basal. Resultados significativos em ###p< 0.001 quando comparado ao grupo tratado com teobromina.



### 5.3.8 Efeito da teobromina no conteúdo total de GLUT4.

A figura 35 mostra o conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo após 90 min de incubação *in vitro*. O efeito da cicloheximida na ação estimulatória da teobromina no conteúdo total de GLUT 4 também foi investigado. Foi observado um aumento significativo no conteúdo total de GLUT4 na presença da teobromina comparado com o grupo controle. A insulina induziu um aumento no conteúdo total de GLUT4. Como pode ser visto, o aumento no conteúdo total de GLUT4 induzido pela teobromina foi significativamente reduzido na presença da cicloheximida (Figura 35).

Figura 35 - Efeito da teobromina no conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo.

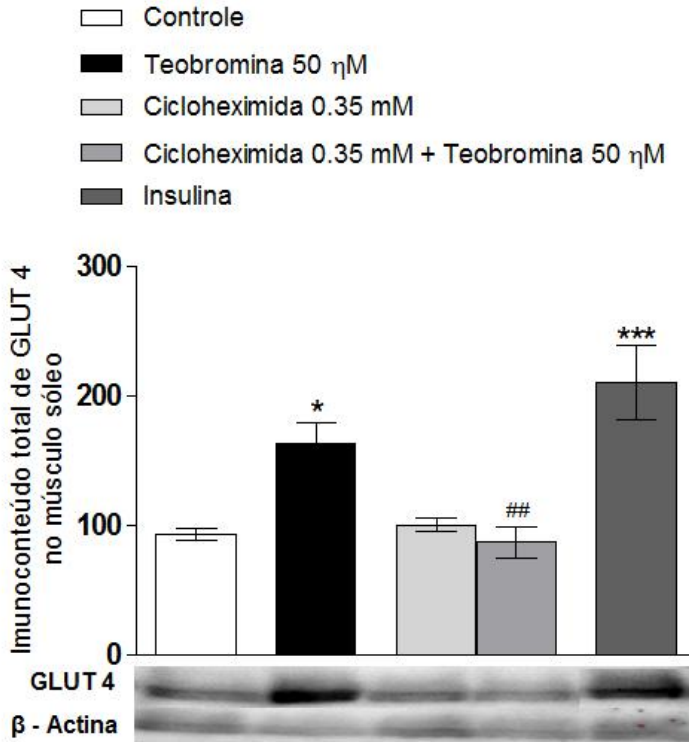


Figura 35 - Efeito da teobromina no conteúdo total de GLUT4 no músculo sóleo após um período de incubação de 90 min *in vitro*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. n= 6 para três experimentos independentes. Os resultados foram considerados significativos para \* $p$ <0.05 quando comparado ao grupo controle;

## $p < 0.01$  quando comparado ao grupo teobromina. O imunoblot representativo para cada grupo é apresentado.

### 5.3.9 Efeito da teobromina na expressão de mRNA de GLUT4

Não houve diferença significativa, entre o grupo controle e o grupo tratado com teobromina, na expressão de mRNA de GLUT4 durante o período de 90 min de incubação (Figura 36).

Figura 36 - Efeito da teobromina na expressão de mRNA de GLUT4.

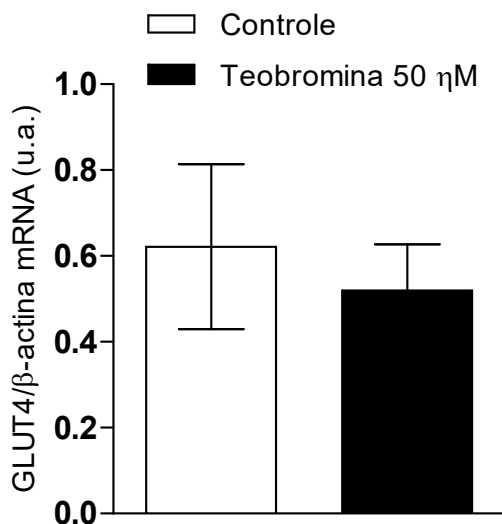


Figura 36 - Efeito da Teobromina na expressão de mRNA de GLUT4 *in vitro*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com  $n = 6$  para cada grupo.

### 5.3.10 Efeito da teobromina em modelo animal de resistência à insulina, induzida por dexametasona.

Como a teobromina aumentou a captação de glicose muscular, buscamos investigar se ela seria capaz de melhorar a resistência à insulina em ratos. A figura 37 demonstra o efeito da teobromina em ratos resistentes à insulina. Em um tratamento de 5 dias, a dexametasona de fato induziu a resistência à insulina nos ratos, por essa metodologia e que, na concentração de 50 mg/Kg, a teobromina melhorou a resistência à insulina em ratos.

Figura 37 - Efeito da teobromina em modelo animal de resistência à insulina, induzida por dexametasona.

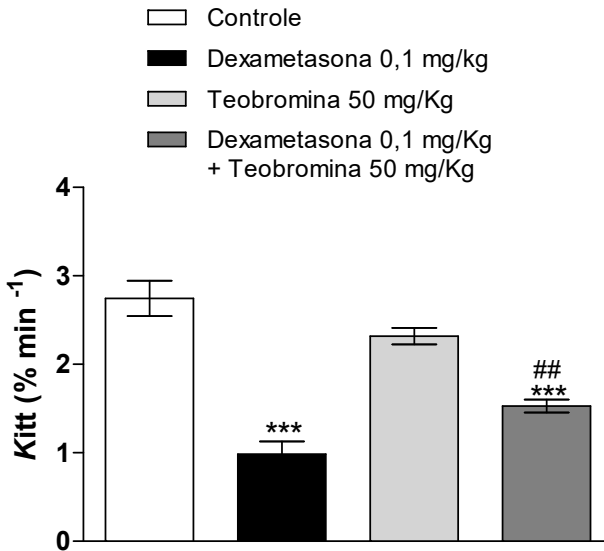


Figura 37 - Taxa de desaparecimento da glicose (% por minuto) durante o teste de tolerância à insulina (KITT, 28 minutos de teste) dos ratos no 6º dia do experimento *in vivo*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6 para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle; ##  $p \leq 0,01$  comparado do grupo dexametasona 0,1 mg/Kg.

A figura 38 demonstra o efeito da teobromina na concentração plasmática de lipídios e na atividade da enzima lactato desidrogenase em ratos resistentes e não resistentes. Observa-se que a teobromina já possui efeito *per se* na diminuição da concentração plasmática de triglicerídeos (figura 38 A), colesterol total (figura 38 B) e VLDL-c (figura 38 D) em ratos não resistentes. Adicionalmente, a teobromina diminuiu a concentração plasmática de triglicerídeos (figura 38 A), colesterol total (figura 38 B), VLDL-c (figura 38 D) e LDL-c (figura 38 E), assim como aumentar a concentração de HDL-c (figura 38 C) nos ratos resistentes. Além disso, neste protocolo experimental, a teobromina não apresentou diferença significativa, quando comparado ao grupo controle, tanto no rato resistente, como no não resistente, quanto à atividade da enzima LDH (figura 38 F).

Figura 38 - Efeito da teobromina na concentração plasmática de lipídios e na atividade da enzima LDH em ratos resistentes e não resistentes.

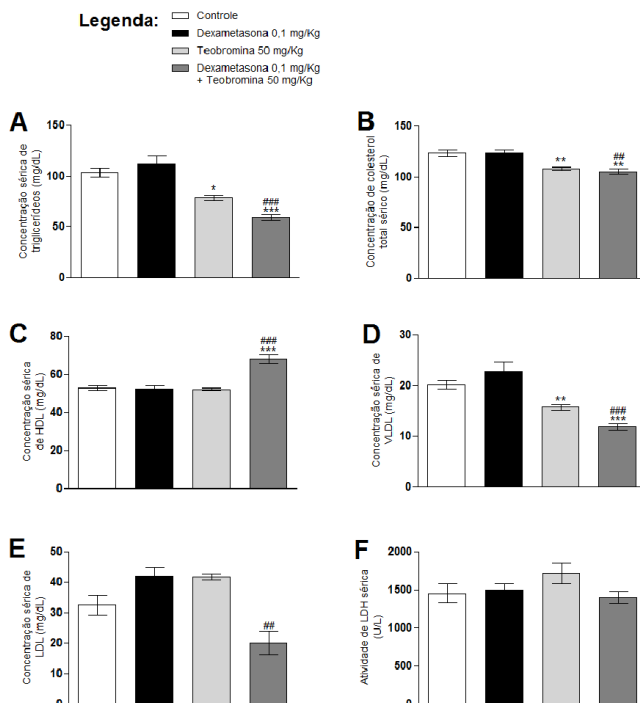


Figura 38 - Concentração sérica de triglicérides (A), colesterol total (B), HDL-c (C), VLDL-c (D), LDL-c (E) e atividade da enzima lactato desidrogenase sérica (F) em ratos tratados com 0,1 mg/Kg de dexametasona e 50 mg/Kg de teobromina durante 5 dias *in vivo*. Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.;  $n=6$  para cada tratamento. \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*  $p \leq 0,01$  e \* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo controle; ###  $p \leq 0,001$  e ##  $p \leq 0,01$  comparado do grupo dexametasona 0,1 mg/Kg.

### 5.3.2 Efeito da teobromina na formação dos Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs).

Outra ação antidiabética estudada foi a redução da formação de AGEs, também investigada através de ensaio *in vitro* (Figura 39). Antes da incubação (dia 0), apenas a fluorescência intrínseca da albumina foi observada, não havendo diferenças estatísticas significativas entre os grupos (Figura 39 A).

Após 7 dias de incubação da albumina com glicose e frutose, foi observado um aumento significativo da formação de AGES, através do aumento da fluorescência (Figura 39 B). Os resultados obtidos para o ensaio de glicação apontam que a teobromina nas concentrações de 5 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , reduziu significativamente a glicação em 7, 14 e 28 dias de incubação (Figura 39 B, 39 C e 39 D).

Figura 39 - Efeito da teobromina na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

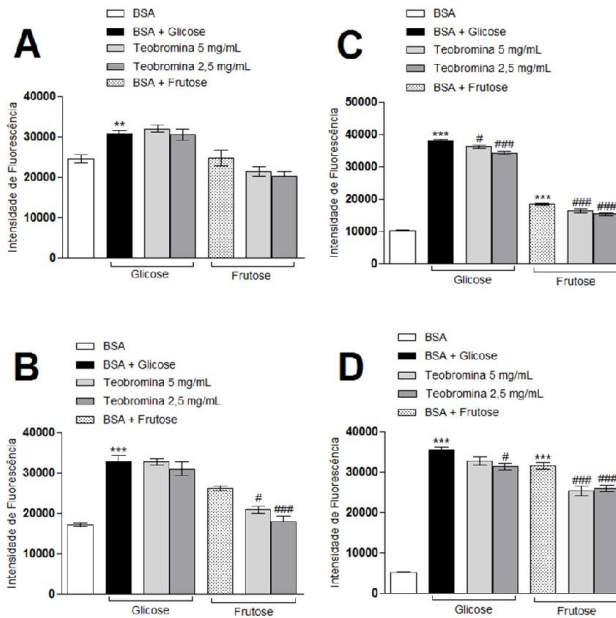


Figura 39 - Efeito da teobromina na formação de AGEs no modelo BSA/glicose ou frutose *in vitro* através da medida de intensidade de fluorescência no dia 0 (A), em 7 dias (B), 14 dias (C) e 28 dias (D). Os valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M.; n= 6. \*\*\* $P \leq 0,001$  comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$ ; ### $p \leq 0,001$  comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

### 5.3.11 Efeito da teobromina na atividade da LDH sérica.

A figura 40 mostra que 3,5 h após o tratamento oral *in vivo* com teobromina não houve alterações na atividade da enzima LDH, sugerindo que este não exibe toxicidade tecidual.

Figura 40 - Efeito da teobromina na atividade da LDH sérica.

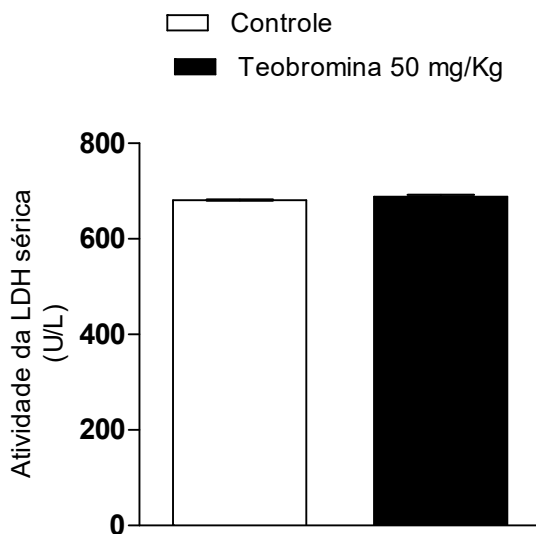


Figura 40 - Efeito da teobromina na atividade da lactato desidrogenase sérica (LDH) 3 horas após tratamento *in vivo*. Valores são expressos como média  $\pm$  E.P.M. com  $n=5$  para cada grupo.



## 6. DISCUSSÃO

A diabetes melito (DM) é considerada uma doença complexa e multifatorial de elevada morbidade e mortalidade e, por esse motivo, é considerada um problema de saúde pública mundial. Sua prevalência mundial está crescendo e, de acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes, 8,3% da população adulta mundial vive com diabetes e estimativas apontam que até 2035 a diabetes atingirá 592 milhões de pessoas. A DM é caracterizada pela hiperglicemia, como consequência da ausência ou diminuição da secreção e ação da insulina. Em longo prazo, quando não tratada, a hiperglicemia está relacionada com o desenvolvimento de doenças micro e macrovasculares, como neuropatia, nefropatia, retinopatia, além de alterações cardíacas e neurovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011; CYPRESS; TOMKY, 2006; WILD et al., 2004; IDF, 2014).

Além disso, o intestino representa uma das primeiras etapas para que a glicose e demais nutrientes sejam absorvidos, portanto, a integridade funcional do intestino é um fator importante para a eficiente absorção e distribuição de glicose para outros tecidos através da circulação (KELLET et al., 2008). Como a glicose é de natureza hidrofílica, esta não se difunde facilmente através da membrana plasmática. Dessa forma, dois principais tipos de transportadores de proteínas participam deste transporte de açúcar: transportadores facilitadores, que são variáveis e aproximadamente proporcionais à absorção de água (transportadores de glicose) e transportadoras ativos de proteínas, que são constantes e não estão associados à absorção de água (transportadores de glicose - SGLTs) (SILVA et al., 2013; LI et al., 2006).

A ação de alguns compostos no controle da absorção intestinal e reabsorção renal de glicose, através da inibição do SGLT1 e SGLT2, respectivamente, consistem em uma estratégia fisiológica para atingir a homeostase glicêmica e, particularmente no intestino, SGLT1 é considerado um alvo potencial para a terapia de drogas para o controle glicêmico em pacientes diabéticos (SILVA et al., 2013; WRIGHT et al., 2004). Neste contexto, torna-se importante o estudo de compostos naturais que possam ter efeito na absorção intestinal de glicose. Além disso, a florizina é bem conhecida como inibidor do co-transportador  $\text{Na}^+$ /glicose e já foi relatado que a absorção de glicose *in vivo* compreende componentes sensíveis e insensíveis à florizina (MANOME & KURIAKI, 1961; SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Dessa forma, o controle glicêmico pode efetivamente prevenir o desenvolvimento e/ou progressão das complicações da diabetes. Este controle pode ser alcançado através de mudanças no estilo de vida e/ou



intervenções farmacológicas. Atualmente, as terapias medicamentosas utilizadas para o controle glicêmico e diabetes incluem a insulina e vários agentes antidiabéticos orais, como as sulfoniluréias, biguanidas, inibidores da  $\alpha$ -glicosidase e glinidas. Porém, além dos efeitos adversos descritos para estes fármacos, eles podem ser de acesso limitado em alguns países em desenvolvimento (ANSELMINO, 2009; CHATURVEDI, 2007; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009). Sendo assim, a utilização de plantas é uma alternativa importante para o tratamento da diabetes.

Muitos compostos naturais já são conhecidos na medicina popular de diferentes culturas pelas propriedades hipoglicemiantes ou antihiperlipidêmicas e pelo uso crescente no tratamento da diabetes. Nesse contexto, o Brasil com uma enorme biodiversidade, pode contribuir no desenvolvimento de novos medicamentos produzidos a partir de plantas medicinais para o tratamento da diabetes. No entanto, existe ainda uma insuficiência de estudos científicos na investigação das propriedades terapêuticas de espécies vegetais nativas do Brasil (DORNAS et al., 2009; GROVER et al., 2002; IVORRA et al., 1989; LI et al., 2004).

A espécie vegetal *Ilex paraguariensis* (IP) é relatada pelo uso popular, além de ser uma das plantas mais estudadas quanto aos efeitos biológicos, principalmente, sobre a ação em doenças crônicas que mais afetam a população mundial e brasileira, como a diabetes melito e a obesidade. Além disso, muitos estudos já relataram um possível potencial antidiabético e antihiperlipidêmico de IP em animais e humanos (PEREIRA et al., 2012; AÇARI et al., 2013; SILVA et al., 2011; KANG et al., 2012; BRACESCO et al., 2011; AÇARI et al., 2011; KLEIN et al., 2011; MORAIS et al., 2009; SILVA et al., 2008), sendo que já existem trabalhos que mostram uma tentativa de transformar o extrato e/ou os compostos extraídos de IP em possíveis medicamentos (DELADINO et al., 2008).

Com relação à caracterização química de IP foi demonstrado que possui compostos fenólicos como constituintes majoritários, assim como metilxantinas e demais classes (PEREIRA et al., 2012). A presença de compostos fenólicos, pode estar relacionada com as atividades biológicas observadas *in vivo* e *in vitro* para as espécies estudadas, visto que existem estudos que relatam a ação destes compostos na homeostasia de glicose (CAZAROLLI et al., 2008).

A fim de compreender melhor o efeito biológico de IP, muitos dos compostos presentes nessa planta já demonstraram atividades biológicas estudadas isoladamente, como a cafeína, o ácido clorogênico, catequinas, ácido cafeico entre outros (ZAHARIEVA & RIDDELL,

2013; ANESINI et al., 2012; GUARINO et al., 2013; MCCARTY et al., 2005; CHO et al., 2010; ONG et al., 2013; BHATTACHARYA et al., 2014; JUNG et al., 2006; AZAY-MILHAU et al., 2013; GUGLIUCCI et al., 2009; MENG et al., 2013). Porém, os mecanismos bioquímicos envolvidos nas ações terapêuticas destes compostos foram pouco estudados e ainda não estão totalmente esclarecidos, por isso é importante investigar mais a respeito dos compostos presentes em *IP* que podem ser responsáveis pelos efeitos biológicos.

Nesse sentido, compostos como o ácido cafeico e a teobromina, presentes em quantidades significativas em *IP* (PEREIRA et al, 2012), tornam-se interessantes focos de estudos com relação à efeitos na homeostasia da glicose.

Com relação aos polifenóis, compostos majoritários de *IP*, devido a diversidade estrutural dos mesmo, torna-se difícil estimar o conteúdo em alimentos, no entanto, existem trabalhos que estimaram as doses de polifenóis (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000; PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2011; GONZÁLEZ et al. 2014). A ingestão média de polifenóis pela população está em torno de 1,2 e 1,12 g / dia (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2010) e a concentração plasmática raramente ultrapassa 1  $\mu$ M após o consumo de 10-100 mg de um único composto fenólico (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Estudos anteriores do grupo no controle da glicemia com diversos compostos naturais (CAZAROLLI et al., 2008; CAZAROLLI et al., 2006; CAZAROLLI et al., 2013; PEREIRA et al., 2011 ; PEREIRA et al., 2012), que também foi profundamente discutido em dois capítulos (SILVA et al., 2013a; SILVA et al., 2013b), justificam a investigação do efeito agudo de alguns compostos naturais na absorção intestinal de glicose

Um dos focos do presente trabalho foi investigar o transportador SGLT1 em um ensaio *in situ*, a fim de compreender melhor o papel de diferentes compostos no transporte intestinal de glicose. Em nossas condições experimentais utilizando 10 mM de glicose, a florizina efetivamente bloqueou a absorção de glicose, indicando que SGLT1 foi inibido. Os experimentos seguintes foram apoiados na influência da florizina (um inibidor específico de SGLT1) na absorção de glicose na ausência (controle) ou na presença de alguns compostos selecionados. O efeito inibitório da florizina na absorção intestinal da glicose está de acordo com trabalhos na literatura que já descrevem esse efeito (GONZALEZ-MUJICA et al., 2003; LI et al., 2006).

Além disso, embora a avaliação da ingestão de polifenóis não esteja ainda muito bem estabelecida, existem relatos na literatura sobre a

ingestão alimentar de naringenina, correspondendo a cerca de 0,2-0,5 para as mulheres e 0,18-0,55 g/d para homens (KOCH et al., 2013). Nesta metodologia estudada *in situ*, a naringenina (em ambas as concentrações testadas), reduziu significativamente a absorção intestinal da glicose em cerca de 74% em comparação com o grupo controle, com apenas glicose, e semelhante ao efeito observado para a florizina. Além disso, com florizina e naringenina juntas, o efeito da florizina na absorção de glicose quase desapareceu, sugerindo uma competição entre eles pelo sítio do SGLT1.

Estes resultados para a naringenina estão de acordo com os relatados na literatura para vesículas da membrana de borda em escova (BBMV) de intestino de coelho e rato, quando comparado com florizina. Além disso, o efeito inibitório da naringenina na absorção de glicose em comparação com a ação potente da florizina está de acordo com o que já foi relatado para a inibição *per se* da naringenina na absorção de glicose descrito por LI et al., 2006.

Além disso, a miricitrina parece ser um potente inibidor da atividade do SGLT1 e também parece ter outros locais de ação no intestino, de acordo com os resultados obtidos neste ensaio *in situ*. Curiosamente, estes resultados são aditivos aos efeitos antidiabéticos da miricitrina, a qual atua na aldose redutase e na captação de glicose em miotubos C2C12 tanto em condições normais quanto estimulados por insulina (DING et al., 2012), o que sugere um papel relevante da miricitrina na homeostase glicêmica.

A quercetina, o principal flavonóide encontrado na dieta (presente 0,3 mg/g na cebola e 10-25 mg/L no chá) (HERTOG, et al., 1992; HERTOGET al., 1993), mostrou uma inibição *in situ* tão boa quanto a florizina na absorção de glicose. Estes resultados estão de acordo com relatos de que a quercetina diminui a glicemia em ratos hiperglicêmicos quando este composto foi administrado por via oral (PEREIRA et al., 2011). Também, para a quercetina, relata-se que a quercetina-3-O'Glucoside não afetou a atividade do SGLT1 e que a aglicona regula a absorção de glicose através da inibição da absorção dependente de GLUT-2 (WILLIAMSON, 2013).

Um dos flavonóides mais abundantes (1 g/L) na infusão de chá verde (LEE et al., 1995), a catequina, inibiu significativamente a absorção de glicose, além de potencializar o efeito inibitório da florizina no transportador intestinal SGLT1, sendo assim, a catequina parece estar agindo por outras vias no intestino que influenciam a absorção de glicose, já que o efeito foi maior do que a ação *per se* da florizina. Como descrito por Kobayashi e colaboradores, a catequina (1 mM) inibiu

significativamente o SGLT1, no entanto, o efeito potencializador deste composto ao efeito da florizina parece ser mediado por outras vias (KOBAYASHI et al, 2000).

Foi observado um perfil similar entre o ácido cafeico, catequina e miricitrina, uma vez que estes compostos potencializaram o efeito inibidor da florizina na absorção de glicose. Analisando esses resultados em conjunto, o SGLT1 parece ser um alvo interessante para alguns compostos que podem ser fisiologicamente importantes para regular a homeostase da glicose durante a ingestão de alimentos.

Tanto a rutina quanto a fukugetina, apresentaram um ligeiro efeito competitivo com florizina na captação de glicose intestinal, pois ambos inibiram o efeito da florizina. A rutina é conhecida por diminuir a glicemia, agindo em vários tecidos envolvidos na homeostase glicêmica (PEREIRA et al., 2011; KAPPEL et al., 2013a; KAPPEL et al., 2013b). Estes resultados reforçam o papel efetivo da rutina como um possível candidato a ser utilizado no controle da hiperglicemia e merece mais investigações. Vale a pena salientar que este foi o primeiro relato do efeito da fukugetina no transportador intestinal SGLT1, podendo então, ser o SGLT1 um alvo para este flavonóide.

Por outro lado, o canferitrina já foi descrito pelo nosso grupo como um agente antihiperglicêmico, reduzindo as concentrações séricas de glicose (JORGE et al., 2004; De SOUSA et al., 2004; PEREIRA et al., 2011). No entanto, neste ensaio *in situ* este composto não alterou a absorção intestinal de glicose (dados não mostrados). Além disso, o ácido clorogênico e a hispidulina também não afetaram a atividade do SGLT1. Assim, parece que os transportadores de glicose intestinal não são o alvo principal para o ácido clorogênico e a hispidulina para regular a homeostase da glicose. Trabalhos na literatura sugerem que o ácido clorogênico apresenta um efeito hipoglicemiante e pode inibir o transporte de glicose (JOHNSTON, CLIFFORD, MORGAN, 2003; NICASIO et al., 2005). No entanto, para a hispidulina foi encontrado apenas um estudo que relata o efeito anti-diabético, porém os detalhes do artigo quanto ao mecanismo de ação deste composto não estavam disponíveis (WU et al., 2011).

Como observado, o ácido cafeico parece agir na absorção intestinal da glicose, sendo assim, outro objetivo do trabalho foi estudar qual o mecanismo de ação do ácido cafeico na homeostasia glicêmica

O ácido cafeico, um ácido fenólico presente diversos tipos de *IP* (PEREIRA et al, 2012) e conhecido por possuir atividade biológica e encontrado também em muitos compostos naturais. Primeiramente foi investigado o efeito na concentração sérica de glicose, e observou-se uma

diminuição na glicemia de ratos em estado hiperglicêmico. Esta ação hipoglicemiante do ácido caféico foi demonstrada em outros estudos em camundongos *db/db*, utilizando contudo, tratamento crônico (JUNG et al., 2006). Além disso, o ácido caféico diminuiu a glicemia de ratos diabéticos (CHAO et al., 2010; HSU et al., 2000; AREND et al., 2011).

Com o intuito de investigar melhor por qual mecanismo o ácido cafeico poderia estar diminuindo as concentrações glicêmicas de animais em estado hiperglicêmico, foi avaliado o efeito na atividade das dissacaridases intestinais. O ácido cafeico parece estar melhorando a homeostasia glicêmica através da capacidade de inibição da atividade das dissacaridases intestinais, já que este composto inibiu a maltose nas concentrações de 1 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$  e a sacarose nas concentrações de 500, 250 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ . Esta atividade do ácido cafeico na atividade de  $\alpha$ -glucosidase, além de corroborar com trabalhos encontrados na literatura (OBOH et al., 2015), pode ser responsável, também, no efeito de *IP* na inibição da atividade das dissacaridases intestinais (PEREIRA et al., 2012).

Sequencialmente, foi investigado o efeito do ácido cafeico na secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas. O efeito do ácido cafeico no aumento da secreção de insulina já foi relatado na literatura, tanto em modelos de cultura de células como em modelos animais (BHATTACHARYA et al., 2014; JUNG et al., 2006; AZAY-MILHAU et al., 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está estabelecido. Dessa forma, estudos foram conduzidos com o objetivo de investigar o mecanismo pelo qual o ácido cafeico aumenta a secreção de insulina pelo pâncreas.

Após realizado um estudo *in vitro*, o ácido cafeico aumentou o influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas, em 10 min de incubação. O influxo de cálcio é necessário para que ocorra a fusão de vesículas contendo insulina com a membrana plasmática da célula do pâncreas, resultando na liberação da mesma para a circulação sanguínea (WOLLHEIM & SHARP, 1981; LIZCANO et al., 2002; SALTIEL et al., 2002; RUTTER & HODSON, 2013; GUERRERO-HERNANDEZ & VERKHRATSKY, 2014). Sequencialmente, foi avaliado o mecanismo envolvido nesse aumento do influxo de cálcio causado pelo ácido cafeico. Para entender tal mecanismo, foram utilizados inibidores de diversas proteínas e canais envolvidos na via de sinalização intracelular para a secreção de insulina. O primeiro mecanismo investigado foi através do canal de potássio dependente de ATP ( $K_{ATP}$ ), utilizando a glibenclamida, uma sulfoniluréia, que se liga aos canais de  $K_{ATP}$ , bloqueando a ativação deste canal, causando uma despolarização na membrana plasmática da

célula beta pancreática e, conseqüente entrada de cálcio, processo primordial para que a secreção de insulina ocorra (RANG, 2007). O ácido cafeico quando incubado sozinho ou em conjunto com a glibenclamida, assim como a glibenclamida, estimularam o influxo de cálcio. No entanto, quando utilizado o diazóxido, um ativador de canais  $K_{ATP}$ , ou seja, não estimulando o influxo de cálcio, o ácido cafeico manteve o efeito, indicando que o mesmo não parece agir diretamente nos canais de  $K_{ATP}$ . No entanto, o ácido cafeico pode modular indiretamente a atividade desse canal, devido ao fato de que ele promove o aumento de influxo de cálcio.

Dessa forma, foram estudados os canais de cálcio presentes na membrana plasmática da ilhota através da utilização de bloqueadores de canais de cálcio dependentes de voltagem. Foram utilizados nifedipina, um bloqueador de canal de cálcio do tipo L, canais que abrem na presença de alta voltagem, e flunarizina, bloqueador de canais de cálcio tipo T, canais abertos com baixa voltagem (RANG, 2007). Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a estimulação do ácido cafeico no influxo de cálcio foi inibida quando este composto foi incubado juntamente com nifedipina, porém o efeito não foi afetado com a incubação com flunarizina. Dessa forma, o mecanismo pelo qual o ácido cafeico aumenta o influxo de cálcio, pode estar envolvendo canais de cálcio do tipo L.

Com isso, foi estudado também o papel do cálcio interno, advindo do retículo endoplasmático. Para tal, utilizamos bloqueadores de canais de cálcio presentes no retículo, como a tapsigargina, um bloqueador de uma ATPase dependente de cálcio na membrana do retículo endoplasmático (SERCA), responsável pela recaptação de cálcio para dentro do RE, quando a concentração do mesmo está baixa no interior do RE. O bloqueio dessa bomba SERCA conduz à perda de cálcio do RE e aumento de cálcio no citosol da célula, mantendo a captação de cálcio extracelular basal. Outro mecanismo estudado, envolvendo o cálcio do RE, foi através do receptor de rianodina (RyR), esse receptor é ativado por uma pequena elevação da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ), provocando o efeito conhecido como liberação de cálcio induzida por cálcio, que amplifica o sinal de cálcio produzido por outros mecanismos, tal como a abertura de canais de cálcio presentes na membrana plasmática ou através da inibição da bomba SERCA (RANG, 2007). Para estudar o RyR, foi utilizado o dantroleno, bloqueador deste receptor.

Após as ilhotas serem tratadas com ácido cafeico e ter o influxo de cálcio estimulado, elas foram incubadas com tapsigargina ou dantroleno e, tanto na presença de dantroleno como na presença da

tapsigargina, o ácido cafeico teve o efeito inibido. Esse resultado mostra que o ácido cafeico pode estar aumentando a concentração de  $[Ca^{2+}]_i$ , através da bomba SERCA e RyR, além de estar estimulando a entrada de cálcio extracelular através de canais do tipo L, o que também pode estar estimulando os RyR a liberarem mais cálcio do RE e, conseqüentemente, ocorrendo a secreção de insulina pela célula beta pancreática.

Em células beta pancreáticas de ratos, as correntes de  $Ca^{2+}$  podem ser moduladas pela fosforilação de algumas proteínas. A ativação das proteínas cinases C e A, PKC e PKA, respectivamente, envolvidas em muitas cascatas de transdução de sinais, pode levar a um ligeiro aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  (RORSMAN et al., 2012). Dessa forma, investigou-se também o envolvimento dessas proteínas cinases no aumento da concentração intracelular de cálcio resultante do tratamento com ácido cafeico. Para isso, foram utilizados os inibidores H89, um inibidor da proteína cinase A, uma proteína cinase dependente de AMP-cíclico (LOCHNER & MOOLMAN, 2006) e RO31-0432, inibidor da PKC, ativada pelo aumento nas concentrações de diacilglicerol (DAG) ou íons cálcio (WILKINSON et al., 1993). Quando as ilhotas foram incubadas com ambos os inibidores, nenhuma diferença foi observada, quando comparada com o grupo tratado apenas com ácido cafeico, ou seja, a inibição dessas proteínas não interferiu na capacidade do ácido cafeico em estimular o influxo de cálcio, demonstrando assim, que é improvável que a PKA ou PKC estejam aumentando essa concentração de cálcio intracelular.

Diante do que foi exposto, podemos concluir que o ácido cafeico possa estar aumentando o influxo de cálcio através de uma possível ação nos canais de cálcio presentes no RE e canais de cálcio do tipo L presentes na membrana plasmática de ilhotas pancreáticas.

Com a finalidade de investigar outros possíveis alvos biológicos do ácido cafeico envolvidos na homeostasia da glicose, foi avaliado o conteúdo de glicogênio hepático e muscular, o qual não apresentou diferença significativa quando comparado com o controle. No entanto, houve uma tendência em aumentar o glicogênio hepático, o que estaria de acordo com a literatura, que relata que o ácido cafeico melhora a resistência à insulina, atuando em enzimas hepáticas em cultura de hepatócitos, como a glicogênio sintase, uma das enzimas responsáveis pela síntese de glicogênio (HUANG & SHEN, 2012; HUANG et al., 2009)

Adicionalmente, o ácido cafeico parece diminuir a geração de AGEs através da inibição das reações de estresse oxidativo durante a reação de Maillard e pela supressão da progressão destas reações em fases

posteriores. Concentrações predominantemente elevadas de glicose favorecem a formação dos produtos finais de glicação avançada AGEs, sendo esse fenômeno um dos principais responsáveis pela geração de muitos dos efeitos colaterais da diabetes, como os nefropatia e retinopatia diabética. Dessa forma, o ácido cafeico pode possuir um efeito protetor em animais ou indivíduos diabéticos, com relação à essas co-morbidades. Além disso, existem trabalhos que mostram que o ácido cafeico, além de possuir propriedades antioxidantes, pode inibir a geração de AGEs e, devido ao fato do ácido cafeico agir em várias etapas da formação de AGEs, cuja principal etapa na qual o ácido cafeico age é a oxidação, que seria a parte final da formação dos AGEs, justifica o fato de que na fase final esta ação fosse mais pronunciada em relação ao início (SASAKI et al., 2014; CHAO et al., 2010; JUNG et al., 2006; GÜLÇİN, 2006; GUGLIUCCI et al., 2009).

Sendo assim, este presente estudo, corrobora com demais trabalhos que demonstram esse efeito tardio do ácido cafeico na formação de AGEs *in vitro* e *in vivo*. O ácido cafeico apresentou um aumento na intensidade de fluorescência quando incubado com frutose no 14º dia, porém no 28º dia esse efeito foi suprimido tanto com glicose, quanto com frutose (SASAKI et al., 2014; CHAO et al., 2010; JUNG et al., 2006; GÜLÇİN, 2006; GUGLIUCCI et al., 2009). Esses resultados indicam que o ácido cafeico pode, também, estar envolvido na capacidade de *IP* diminuir a glicação de proteínas já demonstrado por outros trabalhos (PEREIRA et al., 2012).

Foi estudada também a atividade da lactato desidrogenase e, em 3 h e 30 min após o tratamento com ácido cafeico, não houve alteração na atividade desta enzima, não indicando toxicidade.

Portanto, além da atividade inibitória nas dissacaridases e na absorção intestinal de glicose, o ácido cafeico parece diminuir a concentração sérica de glicose através do aumento na secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas. Dessa forma, o intestino, assim como o pâncreas, parecem ser alvos importantes do ácido cafeico, podendo contribuir assim, nos efeitos conhecidos de *IP* na regulação da glicemia. Além disso, este composto pode desempenhar um efeito protetor contra os principais efeitos adversos da diabetes, através da inibição da geração dos AGEs.

Outro composto presente em *IP*, em concentrações significativas (PEREIRA et al, 2012), que foi foco deste trabalho, foi a teobromina. Embora seja um dos principais compostos presente nesta planta, carece de estudos em relação à ação antidiabética e/ou anti-obesidade, além dos efeitos na homeostasia da glicose, pois os estudos quanto à essas



atividades biológicas deste composto são escassos (REGINATTO et al., 1999).

No presente estudo, a teobromina diminuiu significativamente a glicemia de jejum de animais hiperglicêmicos. Embora este seja o primeiro trabalho que relatou a ação da teobromina na glicemia de jejum de ratos, já tem estudos mostrando a ação do chocolate amargo, rico em teobromina, diminuindo a glicemia, melhorando a sensibilidade à insulina e ajudando na regulação da pressão arterial em humanos saudáveis, assim como nas funções cardiovasculares (GRASSI et al., 2005; FRAGA et al., 2005; RULL et al., 2015). Além disso, outro composto da classe das metilxantinas, a pentoxifilina, é aprovada e utilizada como fármaco vasodilatador (JACOBY & MOHLER, 2004; BAKER & CAMPBELL, 1985; FRAMPTON & BROGDEN, 1995; AVIADO & PORTER, 1984) reforçando a importância de estudar mais sobre essa classe.

Além disso, estudos conduzidos por Neurofingerls e colaboradores (2013) descreveram a ação da teobromina nos lipídios plasmáticos, mais especificamente nas concentrações de HDL-colesterol. O trabalho demonstra que doses diárias de teobromina aumentaram significativamente as concentrações plasmáticas de HDL em homens. Também, existem outros trabalhos que mostram a ação da teobromina em ácidos graxos livres e os demais lipídeos plasmáticos (WAN et al., 2001; DURHAM et al., 1993), demonstrando um possível efeito protetor deste composto contra a obesidade e a diabetes.

Mesmo que trabalhos tenham descrito ações da teobromina na homeostasia lipídica, os mecanismos envolvidos nestas ações ainda são incertos. No presente estudo, esta diminuição nos triglicerídeos plasmáticos também foi confirmada após um tratamento agudo com teobromina. Essa redução observada nos triglicerídeos corrobora também com o trabalho de Eteng e colaboradores (2000) que relataram a diminuição nas concentrações plasmáticas de LDL-colesterol e triglicerídeos, assim como o aumento nas concentrações de HDL-colesterol em ratos, durante um período de 4 dias de tratamento com extrato de semente de cacau, cujo composto majoritário é a teobromina. Além deste estudo, teobromina já possui uma patente ativa pela ação no aumento do HDL-colesterol (UNILEVER NV, 2011). Embora as ações da teobromina no metabolismo de triglicerídeos tenha demonstrado ação significativa, os estudos subsequentes focaram na ação antihiperglicêmica, devido ao fato de ser o primeiro trabalho que relata este efeito da teobromina isolada.

Dessa forma, foi investigado possíveis alvos pelos quais a teobromina diminui a glicemia de ratos em estado hiperglicêmico.

Primeiro estudamos se este composto teria ação nas enzimas digestivas. A alta atividade das enzimas no intestino aumenta a digestão dos açúcares e a absorção de glicose colaborando para o aumento da concentração de glicose sérica pós-prandial. Desta forma, uma das formas mais efetivas para controlar essa hiperglicemia é inibir as enzimas  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase. A acarbose é um inibidor das  $\alpha$ -glicosidases utilizado na prática clínica para melhorar o controle glicêmico em pacientes diabéticos reduzindo a absorção dos carboidratos (FOWLER, 2007).

Existem plantas já relatadas por apresentar efeito antihiperglicêmico através da inibição da atividade das  $\alpha$ -glicosidases (KIM et al., 2004; PEREIRA et al., 2011). Desta forma, foram realizados também experimentos *in vitro* para verificar o efeito da teobromina na atividade das enzimas dissacaridases e nenhuma diferença significativa foi encontrada, mostrando que a teobromina, não reduz a glicemia por esse mecanismo e que ela não é um dos compostos responsáveis por essa ação de IP (PEREIRA et al., 2012).

Sendo assim, foi analisado se a teobromina estaria agindo no conteúdo de glicogênio hepático e muscular. O conteúdo de glicogênio pode ser considerado como um bom marcador para assegurar a atividade hipoglicemiante de qualquer fármaco, pois este indica que a glicose está sendo captada e estocada no fígado e no músculo na forma de glicogênio, podendo ser através do aumento da glicogênese ou aumento na captação de glicose. Muitas plantas são descritas por apresentarem efeito hipoglicemiante através do mecanismo de aumentar a glicogênese, estimulando o consumo e, conseqüentemente, a captação de glicose principalmente pelo fígado e músculo para a formação do glicogênio (NEGRI, 2005). Os resultados do presente trabalho demonstraram que o tratamento com a teobromina aumenta o conteúdo de glicogênio muscular e hepático, indicando também um efeito significativo em tecidos periféricos responsivos a insulina.

Apoiado nesses resultados surgiu à hipótese de que mecanismos bioquímicos envolvidos na ação hipoglicemiante da teobromina possam envolver a estimulação da captação de glicose pelos tecidos e na utilização para a síntese de glicogênio. Esta hipótese foi reforçada após os estudos de captação de glicose no músculo demonstrar um aumento médio de 32% na captação de glicose. Este é o primeiro trabalho que demonstra a ação da teobromina na captação de glicose no músculo porém, outros trabalhos, realizados com humanos, já demonstram o efeito do chocolate amargo, na melhora da sensibilidade à insulina (GRASSI et al., 2005), mecanismo que envolvem os tecidos periféricos responsivos à insulina, como músculo. Dessa forma, pode ser através da estimulação da

captação de glicose que a teobromina seja responsável pela diminuição da glicemia de jejum em ratos em estado hiperglicêmico e da melhora na resistência à insulina causada pelo consumo de chocolate amargo.

Com o intuito de investigar o mecanismo da teobromina no efeito estimulatório na captação de glicose no músculo, foram utilizados inibidores de diversas etapas responsáveis pela entrada de glicose na célula muscular. Para estudar a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, foi utilizado N-etilmaleimida, um agente alquilante que inibe eventos de tráfico vesicular na membrana das células, além da colchicina, um agente despolimerizante de microtúbulos e o wortmanina um inibidor da fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). A ativação da Akt (PKB) pela insulina, via PI3K, é descrita como passo fundamental para a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática e a fusão de vesículas contendo o GLUT4 com a membrana plasmática é essencial para que ocorra a captação de glicose para dentro da célula muscular (HAJDUCH et al., 2001; KANZAKI, 2006).

Quando foi estudado o efeito *per se* da teobromina, esta aumentou a captação de glicose muscular, no entanto quando foi colocada concomitantemente com esses inibidores, com ambos os três, o efeito estimulatório na captação de glicose foi bloqueado. Este resultado demonstra o envolvimento destas vias no aumento da captação de glicose promovido pela teobromina, sendo assim, a teobromina parece influenciar na translocação e fusão de vesículas contendo GLUT4 com a membrana plasmática.

Adicionalmente, foi investigado também a ativação do GLUT4 na membrana da célula muscular, através da utilização do SB239063, inibidor da fosforilação dos subtipos  $\alpha$  e  $\beta$  da p38. A p38 fosforilada possui a capacidade de ativação do GLUT4 (TREMBLAY et al., 2003). Quando o músculo foi incubado com teobromina e, concomitantemente, com SB239063, a capacidade de aumentar a captação de glicose foi inibida. Mostrando assim, que além de estar envolvida na translocação, a teobromina pode também estar participando da ativação do GLUT4 na membrana plasmática da célula muscular.

Ainda, com a finalidade de estudar um possível mecanismo na síntese proteica de GLUT4, o músculo foi incubado com cicloheximida, um inibidor da síntese proteica, por interferir com o passo de translocação (deslocação de duas moléculas de RNA transportador (tRNA) e do RNA mensageiro (mRNA) em relação ao ribossomo), interferindo com a fase de alongamento na tradução. Quando a teobromina foi incubada na presença da cicloheximida, o efeito estimulatório na captação de glicose foi bloqueado, sendo esta ação corroborada com os resultados do *Western*

*blot* utilizando anticorpo- anti glut4, onde, o conteúdo total de GLUT4 foi significativamente menor quando comparado com o grupo teobromina. Assim sendo, estes resultados indicam que a atividade da teobromina parece estar envolvida também com a síntese da proteína GLUT4.

No entanto, pouco se sabe sobre a regulação da etapa de alongamento da biossíntese proteica, uma das três etapas da tradução de proteínas. O processo de alongamento da cadeia peptídica é regulado por eventos de fosforilação/desfosforilação de fatores de alongamento, como o eEF2 (*Eukaryotic elongation factor 2*), induzidos por diversos estímulos. Além disso, o estado de fosforilação da cascata da cinase eEF2K pode ser modulada pela sinalização de moléculas que regulam a atividade deste fator, tais como mTOR e MAPK, incluindo cinases p38, especificamente p38 $\delta$  (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; RISCO & CUENDA, 2012; JUNG et al., 2011).

Sendo assim, para dar continuidade nos estudos de uma possível atividade da teobromina na etapa de tradução de proteínas, foi utilizado PD98059, um inibidor da ativação de MEK1. Este inibidor se liga a formas inativas de MEK1 e impede a ativação pelos demais ativadores da cascata, tais como c-Raf, evitando assim a fosforilação da ERK e, conseqüentemente, impedindo a ativação da cascata de MAP-quinasas, uma via que regula várias atividades celulares, como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose, além de modular a cascata da cinase eEF2K (GONZÁLEZ-TERÁN et al., 2013; RISCO & CUENDA, 2012; ALESSI et al., 1995). Quando a teobromina foi incubada com PD98059, a atividade estimulatória da teobromina na captação muscular de glicose foi inibida, demonstrando mais uma vez, o envolvimento da teobromina na síntese de proteínas, mais especificamente do GLUT4.

Buscando averiguar se a teobromina pode estar atuando na etapa nuclear de síntese proteica, através do aumento da síntese de RNA, foi utilizado a actinomicina D, um inibidor da transcrição, por formar um complexo estável com o DNA de fita dupla, bloqueando o movimento da RNA-polimerase, evitando assim a transcrição e, conseqüentemente, inibindo a síntese de RNA (RANG et al., 2007). Quando a teobromina foi incubada junto com este inibidor não houve interferência na atividade estimulatória da teobromina na captação de glicose no músculo. Este achado pode nos dizer que a teobromina, provavelmente, não está envolvida na transcrição do DNA para sintetizar o GLUT4, resultado esse corroborado com o resultado de qPCR, em que não houve diferença significativa na síntese de RNA do grupo tratado com teobromina comparado ao grupo controle.

Devido ao fato da cicloheximida e o PD98059 anularem o efeito estimulatório da teobromina na captação de glicose e esse efeito não ter sido alterado na presença da actinomicina D, além de não alterar a síntese de RNA, o mecanismo de ação da teobromina parece envolver, além de um efeito na translocação, um aumento da síntese *de novo* de proteínas (GLUT4), sem interferir na transcrição de DNA e consequente síntese de RNA, estando envolvida apenas na fase de alongamento da tradução proteica pela ação do tRNA e do mRNA.

Visto que a resistência à insulina refere-se à uma diminuição na ação da insulina nos tecidos-alvo, responsivos à insulina, tais como o músculo esquelético, adipócitos, e fígado e, no que diz respeito ao tecido muscular, a primeira ação da insulina é estimular a captação de glicose e seu metabolismo (LASRAM et al, 2014; ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010; JOHNSON; OLEFSKY, 2013), buscamos investigar então se esse aumento na captação de glicose estimulada pela teobromina no músculo sóleo dos ratos, poderia melhorar a sensibilidade à insulina em animais resistentes.

Em indivíduos saudáveis, a insulina estimula a captação de glicose no músculo esquelético de um modo dependente da dose. A concentração plasmática de insulina que produz 50% de sua resposta máxima (EC<sub>50</sub>) é de aproximadamente, 60μU/mL, enquanto que em estados de resistência à insulina, a captação de glicose estimulada pela insulina está reduzida no músculo. O tecido muscular é responsável por cerca de 80% da glicose captada da circulação estimulada pela insulina. Estudos indicam que a resistência à insulina no músculo esquelético de indivíduos com diabetes mellitus tipo 2, ocorre não só por uma redução da magnitude da ação da insulina, mas também por um retardo no início da ação da insulina para estimular a captação de glicose. Em pacientes com DM2, a EC<sub>50</sub> da insulina fica em torno de 120–140μU/mL (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010).

A resistência à insulina no músculo esquelético também tem sido relatada em associação com o processo de envelhecimento normal, dislipidemia (aumento de triglicerídeos no plasma/diminuição o HDL-c), e em associação com muitas doenças, assim como pode se desenvolver em doenças agudas graves, ou secundária à um estado inflamatório agudo que prevalece (VAN CROMPHAUT; VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2008). Além disso, a resistência à insulina no tecido muscular também pode se desenvolver secundariamente à uma terapia farmacológica, por exemplo, glicocorticoides (PAGANO et al, 1983), a terapia anti-HIV (HRUZ, 2008), e bloqueadores beta (JACOB et al, 1996).

Estes estudos indicam que, apesar de a resistência à insulina no músculo esquelético ser uma marca do DM2, as consequências metabólicas e clínicas da resistência à insulina (por exemplo, aumento do risco cardiovascular) podem afetar indivíduos não diabéticos também (LASRAM et al, 2014; ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010; JOHNSON; OLEFSKY, 2013).

A teobromina se mostrou promissora quanto ao aumento na captação de glicose muscular tanto através da translocação do GLUT4 para membrana, quanto na síntese proteica desse transportador. E quando realizamos o tratamento dos animais resistentes com esse composto, o mesmo foi capaz de melhorar a resistência à insulina, induzida por dexametasona, em ratos, demonstrando então *in vivo* um possível efeito da teobromina neste modelo de resistência à insulina e podendo correlacionar com o que já havia sido demonstrado *in vitro*, na captação muscular de glicose.

Esse efeito na melhora da sensibilidade à insulina da teobromina já foi relatado na literatura, no entanto, foi com o tratamento com chocolate amargo, rico em teobromina, o ensaio foi realizado em humanos e através de uma metodologia diferente da realizada neste trabalho (GRASSI et al, 2005).

Além disso, uma variedade de anomalias do metabolismo lipídico tem sido descritas em estados insulinoresistentes, algumas das quais podem ser o resultado da própria resistência à insulina, enquanto que outras podem participar como causa. O conceito de lipotoxicidade sustenta que as concentrações circulantes aumentadas de ácidos graxos e/ou acúmulo de lipídios no músculo e no fígado podem levar à resistência à insulina (SAMUEL; SHULMAN, 2012). Desta forma, lipotoxicidade é um fator que contribui para a fisiopatologia dos transtornos metabólicos na obesidade e diabetes mellitus tipo 2, e, em geral, há duas maneiras em que lipídios podem influir negativamente na ação da insulina. Primeiro, os ácidos graxos circulantes podem ativar células sinalizadoras, que interferem com a ação da insulina. Em segundo, o metabolismo da gordura pode provocar a acumulação de produtos lipídicos intracelulares, que causam resistência à insulina (JOHNSON; OLEFSKY, 2013).

Sendo assim, avaliamos também o perfil lipídico dos ratos resistentes tratados com a teobromina e este composto foi capaz de melhorar significativamente o perfil lipídico desses animais diminuindo as concentrações séricas de triglicérides, LDL-c, VLDL-c e colesterol total e aumentando a concentração sérica de HDL-c. Demonstrando, mais uma vez esse efeito da teobromina na melhora da sensibilidade à insulina. Além disso, foi avaliado também quanto à um possível efeito tóxico da

teobromina, através da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) e, durante 5 dias de tratamento, ela não apresentou diferença significativa com o controle em nenhum dos grupos avaliados.

Também estudamos um provável mecanismo de proteção da teobromina em pacientes diabéticos quanto aos danos causados por uma hiperglicemia crônica. Para tanto, avaliamos o efeito da teobromina nos produtos finais de glicação avançada (AGEs). Os AGEs são formadas em situações de hiperglicemia prolongada e a glicação de proteínas altera a função celular e causa alterações em vários tecidos. Adicionalmente, a ligação dos AGEs com receptores específicos (RAGEs) pode levar a modificação na sinalização celular e aumentar a produção de radicais livres. Sendo assim, o acúmulo de AGEs e o aumento do estresse oxidativo contribuem com a patogênese das complicações decorrentes da diabetes (GOH; COOPER, 2008).

Dessa forma, muitos agentes terapêuticos, principalmente produtos naturais, estão sendo investigados quanto à propriedade em inibir ou reverter o progresso da glicação (CHOMPOO et al., 2011; URIOS; BORSOS; STERNBERG, 2007; WU; YEN, 2005). Neste trabalho também estudamos o efeito da teobromina na formação dos AGEs *in vitro*. Os resultados demonstraram um efeito inibitório na formação dos AGEs indicando uma propriedade anti-glicação deste composto. Em 7 dias a teobromina diminuiu a glicação com frutose e em 14 e 28 dias, este composto diminuiu tanto a glicação com glicose, quanto com frutose. Estes resultados mostram que a teobromina pode ser um dos compostos presentes em *IP* responsáveis pelo efeito na diminuição de AGEs, já relatado na literatura (PEREIRA et al., 2012).

Adicionalmente, após 3,5 h de tratamento com teobromina *in vivo*, foi avaliada a atividade de LDH sérica nesses animais. A LDH é uma enzima citoplasmática, portanto aumento na concentração plasmática da mesma pode indicar dano celular, o que não foi observado quando houve um tratamento agudo com a teobromina, quando comparado com o grupo controle.

Portanto, os resultados aqui apresentados sugerem que a teobromina desempenha um importante papel na homeostasia glicêmica, através da estimulação da captação muscular de glicose, podendo assim melhorar a sensibilidade à insulina em animais resistentes, além de ter uma ação anti glicativa, um efeito importante na proteção contra comorbidades relacionadas à diabetes.

## 7. CONCLUSÃO

Apoiado nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que alguns compostos naturais como a miricitrina, quercetina, catequina, naringenina, rutina e fukugetina, presentes em muitas plantas, regulam a absorção de glicose, atuando em um alvo intestinal, o SGLT1. Estes resultados indicam que estes compostos se ligam ao transportador de glicose e antagonizam esse transporte de maneira semelhante à florizina (Figura 41).

Além disso, propõe-se que o composto teobromina e o ácido cafeico, presentes em *Ilex paraguariensis* (IP), aqui estudados, regulam a homeostasia da glicose. Os mecanismos pelo qual o ácido cafeico atua envolve a inibição de enzimas e do co-transportador SGLT1 que permite a absorção intestinal da glicose, o estímulo da secreção de insulina, através do aumento no influxo de cálcio em ilhotas pancreáticas e a inibição da glicação (Figura 42). Enquanto que os mecanismos da teobromina envolvem a utilização de glicose pelos tecidos periféricos, assim como melhora no estado de resistência à insulina, a inibição da glicação de proteínas e melhora no perfil lipídico de animais saudáveis e resistentes (Figura 43). Portanto, a presença destes dois compostos em IP pode ser responsável por muitos dos múltiplos mecanismos de ação de IP para regular a homeostasia da glicose e contribuir para a prevenção das complicações da diabetes.

Figura 41 - Inibição da absorção intestinal de glicose via SGLT1.

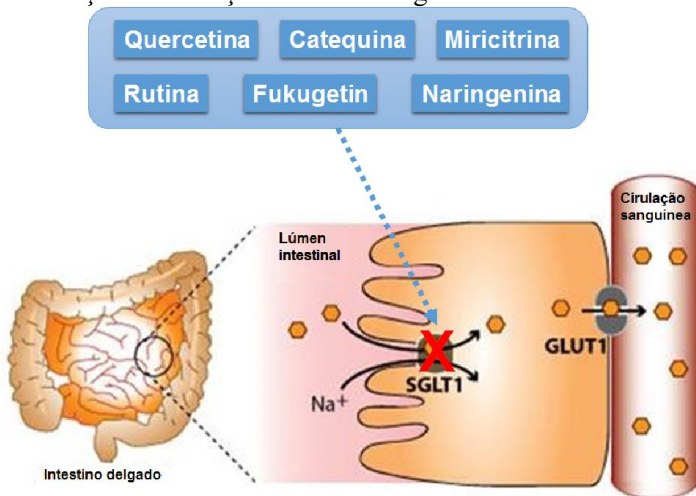




Figura 41 – Efeito dos compostos quercetina, catequina, miricitrina, rutina, fukugetin e naringenina na inibição da absorção intestinal de glicose via SGLT1.

Figura 42 - Mecanismo de ação do ácido cafeico na homeostasia da glicose.

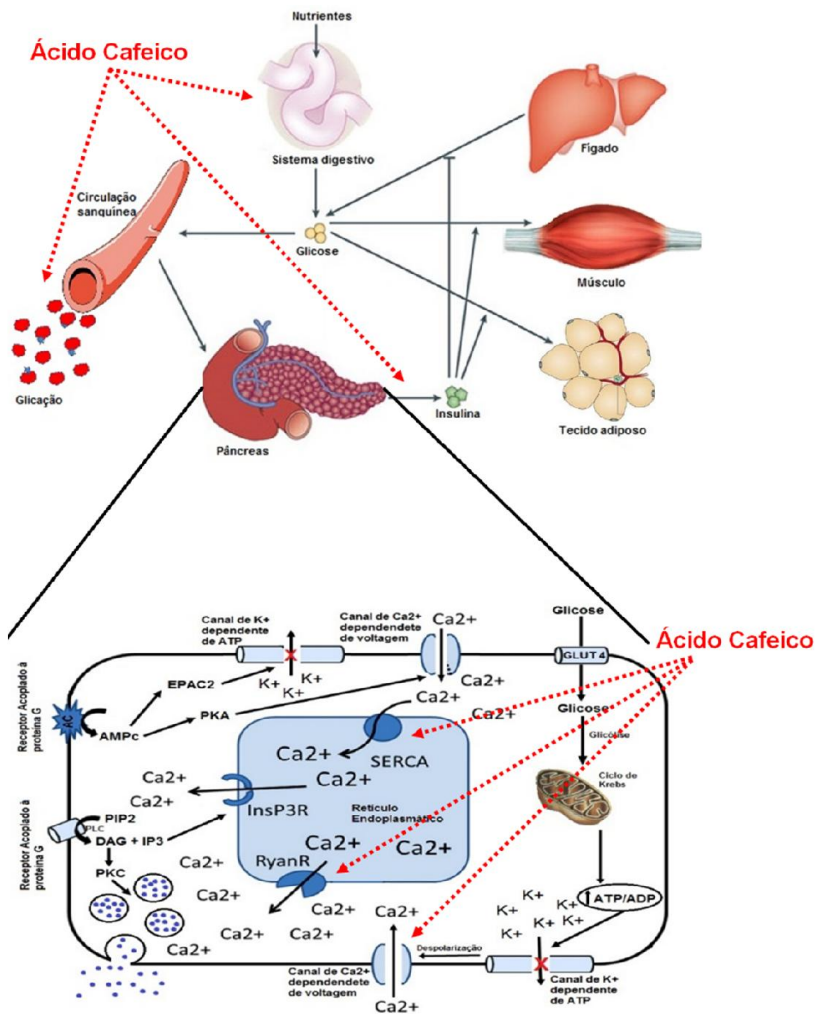


Figura 42 – Mecanismo de ação do ácido cafeico na homeostasia da glicose, segundo os protocolos e doses experimentais testados no presente trabalho.

Figura 43 - Mecanismo de ação da teobromina na homeostasia da glicose.

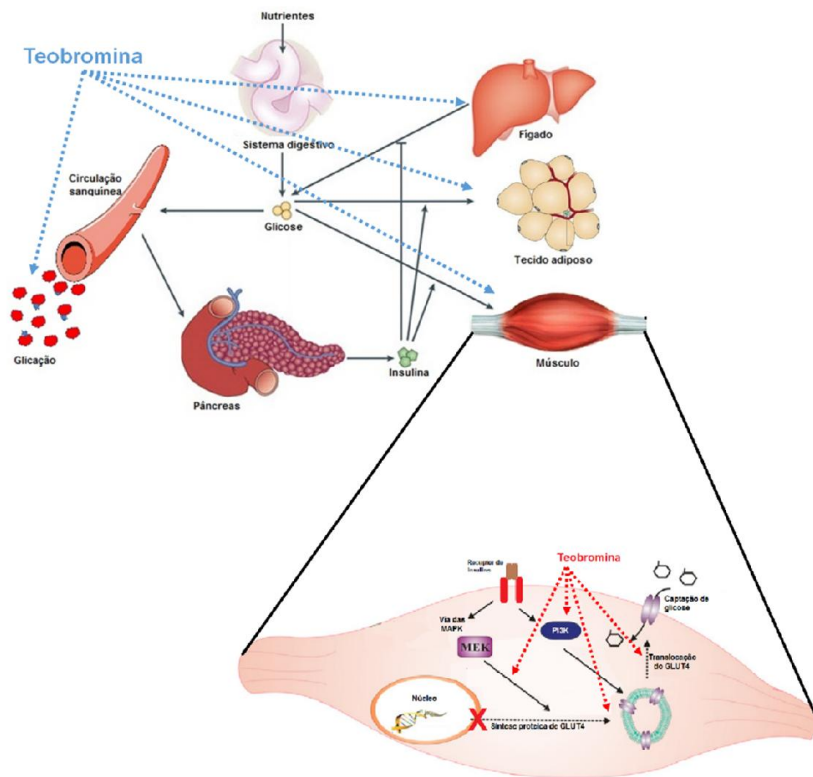


Figura 43 – Mecanismo de ação da teobromina na homeostasia da glicose, segundo os protocolos e doses experimentais testados no presente trabalho.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, M. A. & DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

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

ALAM, M. M.; AHMAD, I.; NASEEM, I. Inhibitory effect of quercetin in the formation of advance glycation end products of human serum albumin: An in vitro and molecular interaction study. **Int J Biol Macromol** v. 14, p. 336-343, 2015.

ALESSI D. R. et al. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. **J Biol Chem**, v. 270, 27489-27494, 1995.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 34, p. 62-69, 2011.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 34, p. 11-61, 2011.

ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **Food Sci Technol**, v. 45, p. 299-304, 2012.

ANSELMINO, M. Cardiovascular prevention in type 2 diabetes mellitus patients: the role of oral glucose-lowering agents. **J Diabet Complications**, v. 23, p.427-433, 2009.

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

ARÇARI, D.P. et al. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Mol Cell Endocrinol**, v. 335, p. 110-115, 2011.

ARÇARI, D.P. et al. Modulatory effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) on the PI3K-AKT signaling pathway. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, p. 1882–1885, 2013.

AREND D. P. et al. Experimental design as a tool to evaluate chlorogenic and caffeic acids extracted from *Cecropia glaziovii* Sneth. **J Pharm Biomed Anal**, v. 1, p. 58-66, 2011.

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

AVIADO, D. M.; PORTER, J. M. Pentoxifylline: a new drug for the treatment of intermittent claudication. Mechanism of action, pharmacokinetics, clinical efficacy and adverse effects. **Pharmacotherapy**, v. 4, p. 297-307, 1984.

AZAY-MILHAU, J. et al. Antihyperglycemic effect of a natural chicoric acid extract of chicory (*Cichorium intybus* L.)- a comparative in vitro study with the effects of caffeic and ferulic acids. **J Ethnopharmacol**, v. 150, p. 755–760, 2013.

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J Diabetes Metab Disord**, v. 12, p. 1-9, 2013.

BAKER, D. E.; CAMPBELL, R. K. Pentoxifylline: a new agent for intermittent claudication. **Drug Intell Clin Pharm**, v. 19, p. 345-348, 1985.

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

BASTOS, D. H. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal Aromatic Plant Sci Biotech**, v. 1, p. 37-46, 2007.

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

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

BECK-NIELSEN, H. The role of glycogen synthase in the development of hyperglycemia in type 2 diabetes- 'To store or not to store glucose, that's the question'. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 28, p. 635–644, 2012.

BERTÉ, K., RUCKER, N., HOFFMANN-RIBANI, R. Yerba maté *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. **Phytothérapie**, v. 9, p. 180-184, 2011.

BERTRAND, C.; VALET, P.; CASTAN-LAURELL, I. Apelin and energy metabolism. **Front Physiol** v. 6, p. 1-5, 2015.

BHATTACHARYA, S. et al. Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells. **Diabetes Obes Metab**, v. 16, p. 602–612, 2014.

BIENSØ, R. S. et al. GLUT4 and Glycogen Synthase Are Key Players in Bed Rest-Induced Insulin Resistance. **Diabetes**, v. 61, p. 1090-1099, 2012.

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

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **J Funct Foods**, v. 5, p. 1057–1064, 2013.

BOUSKILA, M. et al. Allosteric Regulation of Glycogen Synthase Controls Glycogen Synthesis in Muscle. **Cell Metab**, v. 12, p. 456–466, 2010.

BOSCHERO, A. C.; MALAISSE, W. J. Stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXIX. Regulation of  $86\text{Rb}^+$  efflux from perfused islets. **Am J Physiol**, v. 236, p. 139-146, 1979.

BOSE, A. et al. Glucose transporter recycling in response to insulin is facilitated by myosin Myo1c. **Nature** v, 420, p.821-824, 2002.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **J Ethnopharmacol**, v. 136, p. 378–384, 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus. Brasília, DF, 2006.

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

BROWNLEE, M. The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. **Diabetes**, v. 54, p. 1615-1625, 2005.

BRYANT, N. J.; GOULD, G. W. SNARE proteins underpin insulin-regulated GLUT4 traffic. **Traffic**, v. 12, p. 657-664, 2011.

CABRERA, O. et al. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. **PNAS**, v. 103, p. 2334-2339, 2006.

CALCUTT, N. A. et al., Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications- from animal models to clinical trials. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 417-429, 2009.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CASTRO, A. J. G. et al. Betulinic acid and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> share intracellular signal transduction in glucose homeostasis in soleus muscle. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 48, p. 18-27, 2014.

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

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Rev Med Chem**, v. 8, p. 1429-1440, 2008.

CAZAROLLI, L. H. 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.

CAZAROLLI, L. H. et al. Insulin signaling: a potential signaling pathway for the stimulatory effect of kaempferitrin on glucose uptake in skeletal muscle. **Eur J Pharmacol**, v. 712, p. 1-7, 2013.

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 [ $^{14}\text{C}$ ] glucose uptake. **Chem Biol Interact**, v. 179, p. 407-412, 2009.

CHANG, L.; CHIANG, S.H.; SALTIEL, A.R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. **Mol Med**, v. 10, p. 65–71, 2004.

CHAO, C-Y. et al. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, p. 388-395, 2010.

CHO, A.S. et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food Chem Toxicol**, v. 48, p. 937-943, 2010.

CHATURVEDI, N. The burden of diabetes and its complications: Trends and implications for intervention. **Diabetes Res Clin Pract**, v.76S, p. S3–S12, 2007.

CHOMPOO, J. et al. Advanced glycation products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. **Food Chem**, v.129, p.709–715, 2011

CYPRESS, M.; TOMKY, D. Microvascular Complications of Diabetes. **Nurs Clin North Am**, v.41, p.719–736, 2006.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 44, p. 169-172, 1984.

DAMAZIO, R. G. et al. Nitrochalcones: Potential in vivo insulin secretagogues, **Biochimie**, v. 91, p. 1493-1498, 2009.

DEL P. S.; TIENGO, A. The importance of first-phase insulin secretion: implications for the therapy of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 17, p. 1164-1174, 2001.



DELADINO, L. et al. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydr Polym**, v. 71, p. 126-134, 2008.

DE SOUSA E. et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. **J Nat Prod**, v. 67, p. 829-32, 2004.

DING, Y. et al. Myricetin attenuates hyperinsulinemia-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. **Eur Food Res Technol**, v. 234, p. 873-881, 2012.

DORNAS, W. C. et al. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais. **Braz J Pharmacog**, v.19, p. 488-500, 2009.

DREW, B.G. et al. The emerging role of HDL in glucose metabolism. **Nat Rev Endocrinol**, v. 8, p. 237-245, 2012.

DROZDOWSKI, L.A.; THOMSON, A.B. Intestinal sugar transport. **World J Gastroenterol**, v. 12, p.1657-1670, 2006.

DUBE, P. E.; BRUBAKER, P. L. Nutrient, neural and endocrine control of glucagon-like peptide secretion. **Horm Metab Res**, v. 36, p. 755-760, 2004.

DURHAM, T. L. et al. Effects of theobromine ingestion on plasma fatty acids, glycogen, and exercise endurance in untrained rats. **Sports Med Train Rehabil**, v. 4, p. 205-210, 1993.

EID, H. M. et al. The molecular basis of the antidiabetic action of quercetin in cultured skeletal muscle cells and hepatocytes. **Pharmacogn Mag** v. 11, p. 74-81, 2015.

ETENG, M. U.; ETTARTH, R. R. Comparative effects of theobromine and cocoa extract on lipid profile in rats. **Nutri Res**, v. 20, p. 1513-1517, 2000.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL DE DIABETES. Disponível em: <http://www.idf.org/worlddiabetesday/toolkit/gp/facts-figures>. Acesso em: 21/03/2015.

- FERRER, J. C. et al. Control of glycogen deposition. **FEBS Letters**, v. 546, p. 127–132, 2003.
- FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, p. 774–778, 2001.
- 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. **Clin Diabetes**, v. 25, p. 107-109, 2007.
- FRAGA, C. G. Cocoa, diabetes, and hypertension: should we eat more chocolate? **Am J Clin Nutr**, v. 81, p. 541-542, 2005.
- FRAMPTON, J. E.; BROGDEN, R. N. Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders. **Drugs Aging**, v. 7, p. 480-503, 1995.
- FREDERICO, M. J. S. et al. Acylhydrazones contribute to serum glucose homeostasis through dual physiological targets. **Curr Top Med Chem**, v. 12, p. 2049-2058, 2012.
- FREDERICO, M. J. S. et. al. Antidiabetic effects of sulfonamide derivatives based on structural fragment of sulfonylureas. **Curr Trends Med Chem**, v. 7, 2013.
- 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, p. 25-53, 2013.
- FURTADO, L.M.; POON, V.; KLIP, A. GLUT4 activation: thoughts on possible mechanism. **Acta Physiol Scand**, v. 178, p. 287–296, 2003.
- GOH, S.; COOPER, M. E. The Role of Advanced Glycation End Products in progression and Complications. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p.1143-1152, 2008.

GOLDIN, A. et al. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. **Circulation**, v. 114, 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](http://www.proac.uff.br/farmacoclinica/sites/default/files/diretrizes09_fi nal_0.pdf). Acesso em: 21/03/2014.

GOMIS, R. Inibidores de las disacaridasas. **Endocrinol Nutr**, v. 55, p. 13-16, 2008.

GONZALEZ-MUJICA, F. et al. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **Fitoterapia**, v. 74, p. 84-90, 2003.

GONZÁLEZ, S. et al. Dietary intake of polyphenols and major food sources in an institutionalised elderly population. **J Hum Nutr Diet**, v. 27, p. 176-183, 2014.

GONZÁLEZ-TERÁN, B. et al. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF- $\alpha$  translation in LPS-induced hepatitis. **J Clin Invest**, v. 123, p. 164-178, 2013.

GRASSI, D. et al. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. **Am J Clin Nutr**, v. 81 p. 611-614, 2005.

GROVER, J. K.; YADAV, S.; VATS, V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential. **J Ethnopharmacol**, v. 81, p. 81-100, 2002.

GRUSOVIN, J.; MACAULAY, S. L. Snares for GLUT4 - Mechanisms Directing Vesicular Trafficking of GLUT4. **Front Biosci**, v. 8, p. 620-641, 2003.

GUARINO, M. P. et al. Chronic caffeine intake reverses age-induced insulin resistance in the rat- effect on skeletal muscle Glut4 transporters and AMPK activity. **AGE**, v. 35, p. 1755-1765, 2013.

- GUERRERO-HERNANDEZ, A.; VERKHRATSKY, A. Calcium signalling in diabetes. **Cell Calcium**, v. 56, p. 297-301, 2014.
- GUGLIUCCI, A. et al. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, p. 339-344, 2009.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, p. 213-220, 2006.
- HAJDUCH, E., LITHERLAND, G.J., HUNDAL, H.S. Protein kinase B (PKB/Akt) – a key regulator of glucose transport? **FEBS Lett**, v. 492, p. 199–203, 2001.
- HALSE, R. et al. Control of Glycogen Synthesis by Glucose, Glycogen, and Insulin in Cultured Human Muscle Cells. **Diabetes**, v. 50, p. 720-726, 2001.
- HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G.; Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*), a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **J Food Sci**, v. 72, p.138–151, 2007.
- HEDIGER, M. A.; COADY, M. J.; IKEDA, T. S.; WRIGHT, E. M. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. **Nature**, v. 330, p. 379–381, 1987.
- HENQUIN, J. C. et al. Hierarchy of the beta-cell signals controlling insulin secretion. **Eur J Clin Invest**, v. 33, p. 742-750, 2003.
- HENQUIN, J. C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. **Diabetes**, v. 49, p. 1751-1760, 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. 1767-1775, 2006.
- HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J Agric Food Chem**, v. 40, p. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. **J Agric Food Chem**, v. 41, p. 1242-1246, 1993.

HIRIART, M.; AGUILAR-BRYAN, L. Channel regulation of glucose sensing in the pancreatic beta-cell. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295, p. 1298-1306, 2008.

HOFFMAN, N. J.; ELMENDORF, J. S. Signaling, cytoskeletal and membrane mechanisms regulating GLUT4 exocytosis. **Cell**, 22, p. 110-116, 2011.

HØJLUND, K. Metabolism and insulin signaling in common metabolic disorders and inherited insulin resistance. **Dan Med J**, v. 61, p. B4890, 2014.

HOU, J.C.; PESSIN, J.E. Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUTs trafficking. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, p. 466-473, 2007.

HRUZ, P. W. HIV protease inhibitors and insulin resistance: lessons from in-vitro, rodent and healthy human volunteer models. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 3, p. 660-665, 2008.

HSU, F. L.; CHEN, Y. C.; CHENG, J. T. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. **Planta Med**, v. 66, p. 228-230, 2000.

HUANG, D.-W., & SHEN, S.-C. Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. **J Funct Foods**, doi:10.1016/j.jff.2012.01.005, 2012.

HUANG, D.-W. et al. Effects of Caffeic Acid and Cinnamic Acid on Glucose Uptake in Insulin-Resistant Mouse Hepatocytes. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 7687-7692, 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, p. 20417-20423, 1995.

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

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

JACOB, S. et al. Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. **J Hypertens**, v. 14, p. 489-494, 1996.

JACOBY, D.; MOHLER, E. R. 3rd. Drug treatment of intermittent claudication. **Drugs**, v. 64, p. 1657-70, 2004.

JAKUS, V.; RIETBROCK, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. **Physiol Res**, v. 53, p. 131-142, 2004.

JAMES et al. - THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 26, p. 5-20, 2003.

JOHNSON, A. M. F. and OLEFSKY, J. M. The Origins and Drivers of Insulin Resistance. **Cell**, v. 152, p. 673-684, 2013.

JOHNSTON, K. L.; CLIFFORD, M. N.; MORGAN, L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. **Am J Clin Nutr**, v. 78, p. 728-733, 2003.

JORGE, A. P. et al. Insulinomimetic effects of kaempferitrin on glycaemia and on <sup>14</sup>C-glucose uptake in rat soleus muscle. **Chem Biol Interact**, v. 149, p. 89-96, 2004.

JUNG, G. A. et al. Methylation of eukaryotic elongation factor 2 induced by basic fibroblast growth factor via mitogen-activated protein kinase. **Exp Mol Med**, v. 43, p. 550-560, 2011.

JUNG, U.J. et al. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db-db mice. **JPET**, v. 318, p. 476-483, 2006.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, p. 840-846, 2006.

KANG, Y.R. et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL-6J mice fed a high-fat diet. **Lab Anim Res**, v. 28, p. 23-29, 2012.

KANZAKI, M. Insulin receptor signals regulating GLUT4 translocation and actin dynamics. **Endocrine J**, v. 53, p. 267–293, 2006.

KAPPEL, V. D. et al. Involvement of GLUT-4 in the stimulatory effect of rutin on glucose uptake in rat soleus muscle. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, p. 1179–1186, 2013a.

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

KAPPEL, V. D. et al. Rutin potentiates calcium uptake via voltage-dependent calcium channel associated with stimulation of glucose uptake in skeletal muscle. **Arch Biochem Biophys**, v. 532, p. 55-60, 2013b.

KAPPEL, V. D. et al. The role of calcium in intracellular pathways of rutin in rat pancreatic islets: potential insulin secretagogue effect. **Eur J Pharmacol**, v. 702, p. 264–268, 2013c.

KAPPEL, V. D. et al. Beneficial effects of banana leaves (*Musa x paradisiaca*) on glucose homeostasis: multiple sites of action. **Rev bras farmacogn**, v. 23, p. 706-715, 2013d.

KAZMI, I. et al. Antiobesity potential of ursolic acid stearyl glucoside by inhibiting pancreatic lipase. **Eur J Pharmacol**, v. 709, p. 28–36, 2013.

KELLETT, G. L. et al. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. **Annu Rev Nutr**, v. 28, p. 35-54, 2008.

KELLETT, G. L.; BROT-LAROCHE, E. Apical GLUT2 A Major Pathway of Intestinal Sugar Absorption. **Diabetes**, v. 54, p. 3056-3062, 2005.

KHAN, A.H.; PESSIN, J.E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. **Diabetologia**, v. 45, p. 1475-1483, 2002.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 68, p. 200-205, 2004.

KIM, Y. M.; WANG, M. H.; RHEE, H. I. A novel  $\alpha$ -glucosidase inhibitor from pine bark. **Carbohydr Res**, v. 339, p. 715-717, 2004.

KLEIN, G. A. et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals- a pilot study. **J Am Coll Nutr**, v. 30, p. 320-332, 2011.

KLIP, A. The many ways to regulate glucose transporter 4. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, p.481-487, 2009.

KOBAYASHI, Y. et al. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 5618-5623, 2000.

KOCH, W. et al. Application of TLC method with video scanning in estimation of daily dietary intake of specific flavonoids--preliminary studies. **Acta Pol Pharm**, v. 70, p. 611-620, 2013.

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

KOSKI, R.R. Practical review of oral antihyperglycemic agents for type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Educ**, v. 32, p.869-876, 2006.

KRAMER A, et al. Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. **Science**, v. 294, p. 2511-2515, 2001.



KRASIKOV, V. V.; KARELOV, D. V.; FIRSOV, L. M. alpha-Glucosidases. **Biochem (Mosc)**, v. 66, p. 267-281, 2001.

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

KULKARNI, R. N. The islet beta-cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, p. 365-371, 2004.

LAPA, F. DA R. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in Mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, p. 306-315, 2009.

LASRAM, M. M. et al. A review on the molecular mechanisms involved in insulin resistance induced by organophosphorus pesticides. **Toxicology**, v. 322, p. 1-13, 2014.

LEE, M. J. et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 4, p. 393-399, 1995.

LEDUC, C. et al. Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany. **J Ethnopharmacol**, v. 105, p. 55-63, 2006.

LETO, D.; SALTIEL, A. R. Regulation of glucose transport by insulin-traffic control of GLUT4. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 13, p. 383-396, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. Carbohydrate intake. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 108, p. 113-127, 2012.

LETURQUE, A.; BROT-LAROCHE, E.; LE GALL, M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 296, p. 985-992, 2009.

LI, J. M. et al. Inhibition of intestinal and renal Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter by naringenin. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, p. 985-995, 2006.

LI, W. L. et al. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **J Ethnopharmacol**, v. 92, p. 1-21, 2004.

- LIU, Y. et al. Jinlida reduces insulin resistance and ameliorates liver oxidative stress in high-fat fed rats. **J Ethnopharmacol**, v. 162, p. 244-252, 2015
- LIU, X. J. et al. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. **Cell Signal**, v. 18, p. 2071-2076, 2006.
- LIZCANO, J. M.; ALESSI, D. R. The insulin-signalling pathway. **Curr Biol**, v. 12, p. 236-238, 2002.
- LOCHNER, A.; MOOLMAN, J. A. The many faces of H89: a review. **Cardiovasc Drug Rev**, v. 24, p. 261-74, 2006.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MANACH, C., MAZUR, A., SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Curr Opin Lipidol**, v. 16, p. 1-, 2005.
- MANOME, S.; KURIAKI, K. Effect of insulin, phlorizin and some metabolic inhibitors on the glucose absorption from the intestine. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 130, p. 187-194, 1961.
- MARKAN, K.R.; JURCZAK, M. J.; BRADY, M. J. Stranger in a strange land- Roles of glycogen turnover in adipose tissue metabolism. **Mol Cell Endocrinol**, v. 318, p. 54-60, 2010.
- MARTINET, A.; et al.; NMR and LC-MS in characterization of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. **Phytochem Anal**, v. 12, p. 48-52, 2001.
- MATSCHINSKY, F. M. Banting Lecture 1995. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. **Diabetes**, v. 45, p. 223-241, 1996.
- McCARTY, M.F. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. **Med Hypotheses**, v. 64, p. 848-853, 2005.

MEJIA, E.G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*)- Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **J Funct Foods**, v. 2, p. 23–34, 2010.

MENG, S. et al. Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism- A Review. **J Evid Based Complement Altern Med**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

MENINI, T., *et al.*; Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Med**, v. 73, p. 1141–1147, 2007.

MEOTTI, F. C. et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 1707-1713, 2006.

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](http://www.merckmanuals.com/professional/endocrine_and_metabolic_disorders/diabetes_mellitus_and_disorders_of_carbohydrate_metabolism/diabetes_mellitus_dm.html). Acesso em: 21/03/14.

MIKHAIL, N. Use of sodium-glucose cotransporter type 2 inhibitors in older adults with type 2 diabetes mellitus. **South Med J**, v. 108, p. 91-96, 2015.

MOORE, M. C.; CHERRINGTON, A. D.; WASSERMAN, D. H. Regulation of hepatic and peripheral glucose disposal. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, p. 343-364, 2003.

MORAIS, E. C. et al. Consumption of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Improves Serum Lipid Parameters in Healthy Dyslipidemic Subjects. **J Agric Food Chem**, v. 57, p. 8316-8324, 2009.

MOREIRA, F. P. M. et al. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* –bioatividade sobre *Artemia salina*. **Quim Nova**, v. 26, p. 309-311, 2003.

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

MUKHERJEE, P.K. et al. Leads from indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. **J Ethnopharmacol**, v. 106, p. 01-28, 2006.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 9, p. 193-205, 2008.

NARDI, G. M. et al. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 107, p. 73-78, 2006.

NARDINI, M. et al. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. **Free Radic Biol Med**, v. 19, p. 541-552, 1995.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Brazilian J Pharm Sci**, v. 41, p.121-142, 2005

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NEUFINGERL, N. et al. Effect of cocoa and theobromine consumption on serum HDL-cholesterol concentrations- a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr**, v. 97, p. 1201-1209, 2013.

NICASIO, P. et al. Hypoglycemic effect and chlorogenic acid content in two Cecropia species. **Phytother Res**, v. 19, p. 661-664, 2005.

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: 21/03/2015.

OBOH, G. et al. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 26, p. 165-170, 2015.

ONG, K.W., HSU, A., TAN, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. **Biochem Pharmacol**, v. 85, p. 1341-1351, 2013.

ORCI, L. The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit

to the assembly line. The Minkowski lecture 1973 revisited. **Diabetologia**, v. 28, p. 528-546, 1985.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biol**, v. 2, p. 411-429, 2014.

OUBRÉ, A.Y. et al. From plant to patient: an ethnomedical approach to the identification of new drugs for the treatment of NIDDM. **Diabetologia**, v. 40, p. 614-617, 1997.

PAGANO, G. et al. An in vivo and in vitro study of the mechanism of prednisone-induced insulin resistance in healthy subjects. **J Clin Invest**, v. 72, p. 1814–1820, 1983.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2, p. 270-278, 2009.

PEPPA, M.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Glucose, advanced glycation products, and diabetes complications: what is new and what works. **Clin Diabetes**, v. 21, p. 186-7, 2003.

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

PEREIRA, D. F. et al. Effects of flavonoids on  $\alpha$ -glucosidase activity: potential targets for glucose homeostasis. **Nutrition**, v. 27, p. 1161-1167, 2011.

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

PEREZ-JIMENEZ, J. et al. Dietary intake of 337 polyphenols in French adults. **Am J Clin Nutr**, v. 93, p. 1220-1228, 2011.

PEREZ-JIMENEZ J. et al. Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. **J Agric Food Chem**, v. 58, p. 4959-4969, 2010.

- PIMENTEL, G.D. et al. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **J Nutr Biochem**, v. 24, p. 809–818, 2013.
- PIZZOLATTI, M. G. et al. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (Leguminosae). **Quim Nova**, v. 26, p. 466-469, 2003.
- POWELL, J.; MILLER, S. A.; TAYLOR, J.R. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: the new option for diabetes mellitus management. **South Med J**, v. 108, p. 82-90, 2015.
- RAFACHO, A. et al. Functional Alterations in Endocrine Pancreas of Rats With Different Degrees of Dexamethasone-Induced Insulin Resistance. **Pancreas**, v. 36, p. 284-293, 2008.
- RAHBAR, S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1043, p. 9-19, 2005.
- RANG, H.P. et al. Farmacologia. Elsevier, 6ª ed. 2007.
- REGINATTO, F. H. et al. Methylxanthines accumulation in *Ilex* species - caffeine and theobromine in erva-mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* species. **J Braz Chem Soc**, v. 10, p. 443- 446, 1999.
- RICHTER, E.A.; HARGREAVES, M. Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. **Physiol Rev**, v. 93, p. 993–1017, 2013.
- RISCO, A.; CUENDA, A. New Insights into the p38 $\gamma$  and p38 $\delta$  MAPK Pathways. **J Signal Transduct**, v. 2012, p. 1-8, 2012.
- ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr Mol Med**, v. 2, p. 101–120, 2002.
- ROACH, P. J. et al. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochem J**, v. 441, p. 763–787, 2012.
- RORSMAN, P.; BRAUN, M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 155-179, 2013.

RORSMAN, P.; BRAUN, M.; ZHANG, Q. Regulation of calcium in pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cells in health and disease. **Cell Calcium**, v. 51, p. 300–308, 2012.

RULL, G. et al. Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. **Vascul Pharmacol**, doi: 10.1016/j.vph.2015.02.010, 2015.

RUTTER, G. A.; HODSON, D. J. Minireview- intraislet regulation of insulin secretion in humans. **Mol Endocrinol**, v. 27, p. 1984-1995, 2013.

SAKAMOTO, K.; HOLMAN, G. D. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 295, p. 29–37, 2008.

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

SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signalling pathways in time and space. **Trends Cell Biol**, v. 12, p. 65-71, 2002.

SAMUEL, V. T. and SHULMAN, G. I. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. **Cell**, v. 148, p. 852-871, 2012.

SANTER, R. et al. Intestinal Glucose Transport: Evidence for a Membrane Traffic–Based Pathway in Humans. **Gastroenterology**, v. 124, p.134–39, 2003.

SASAKI, K.; CHIBA, S.; YOSHIZAKI, F. Effects of natural flavonoids, stilbenes and caffeic acid oligomers on protein glycation. **Biomed Rep**, v. 2, p. 628-632, 2014.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. et al. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SCHEEN, A. J.; LEFEBVRE, P. J. Oral antidiabetic agents. A guide to selection. **Drugs**, v. 55, p. 225-236, 1998.

SCHEEPERS, A.; JOOST, H. G.; SCHURMANN, A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 28, p. 364-371, 2004.

SCHINELLA, G. et al. Antioxidant and cardioprotective effects of *Ilex brasiliensis*- A comparative study with *Ilex paraguariensis* (yerba mate). **Food Res Int**, v. 42, p. 1403–1409, 2009.

SEMIZ, S. et al. Conventional kinesin KIF5B mediates insulin-stimulated GLUT4 movements on microtubules. **EMBO J**, v. 22, p. 2387-2399, 2003.

SHARIF, A. Current and emerging antiglycaemic pharmacological therapies: The renal perspective. **Nephrology**, v. 16, p. 468–475, 2011.

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, p. 647-656, 1998.

SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Res Int**, v. 41, p. 973-979, 2008.

SILVA, F. R. M. B. et al. 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.

SILVA, F. R. M. B. et al. Glucose uptake: knowledge from in vivo, in situ and in vitro studies and health implications. Glucose Uptake: Regulation, Signaling Pathways & Health Implications. **Nova Science Publishers**, New York, 1, p.1-44, 2013a.

SILVA, F. R. M. B. et al. Kaempferol and Kaempferitrin: Nutraceutical compounds contribute to glucose homeostasis by acting at multiple biological sites. **Nova Science Publishers**, New York, 2013b.

SILVA, R. D.A. et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, p. 818–826, 2011.



SIMÕES, C. M. O. Investigação químico-farmacológica de Achyroline satureoides (Lam.) D. C. Compositae (Marcela). 1984. 186 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

SINGH, R. et al. Advanced glycation end-products: a review. **Diabetologia**, v. 44, p. 129-146, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.

SOMSÁK, L. et al. New Inhibitors of Glycogen Phosphorylase as Potential Antidiabetic Agents. **Curr Med Chem**, v. 15, p. 2933-2983, 2008.

STÖCKLI, J. FAZAKERLEY, D. J.; JAMES, D. E. GLUT4 exocytosis. **J Cell Sci**, v. 124, p. 4147-4159, 2011

STEINER, D. F.; CHAN, S. J. C.; RUBENSTEIN, A. H. Biosynthesis of Insulin. **Compr Physiol**, 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.

STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 18, p. 451-463, 2002.

TAHA, C.; KLIP, A. The insulin signaling pathway. **J Membr Biol**, v. 169, p. 1-12, 1999.

TANIGUCHI, C.M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C.R. Critical nodes in signaling pathways: insights into insulin action. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 7, p.85-96, 2006.

TASKINEN, M. R. Type 2 diabetes as a lipid disorder. **Curr Mol Med**, v. 5, p. 297-308, 2005.

TASKINEN, M. R.; BORÉN, J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. **Atherosclerosis**, v. 239, p. 1-31, 2015.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, p. 141-145, 2010.

THURMOND, D. C. Regulation of insulin action and insulin secretion by SNARE-mediated vesicle exocytosis. In Mechanisms of Insulin Action. Saltiel AR and Pessin JE, Eds. Georgetown, TX, **Landes Bioscience**, p. 52–70, 2000.

TOUSCH, D. et al. Chicoric acid, a new compound able to enhance insulin release and glucose uptake. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 377, p. 131–135, 2008.

TREMBLAY, F.; DUBOIS, M.; MARETTE, A. Regulation of Glut4 Traffic and Function by Insulin and Contraction in Skeletal Muscle. **Front Biosci**, v. 8, p.1072-1084, 2003.

TURK, E.; MARTÍN, M. G.; WRIGHT, E. M. Structure of the human Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter gene SGLT1. **J Biol Chem**, v. 269, p. 15204-15209, 1994.

UNILEVER NV (Holanda). Richard Draijer; Den Born Bert-jan Hendrik van. **Theobromine for increasing hdl-cholesterol**. NL n° WO2011144545 A1, 16 maio 2011, 24 nov. 2011.

URIOS, P.; GRIGOROVA-BORSOS, A. M.; STERNBERG, M. Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. **Eur J Clin Nutr**, v. 46, p. 139-146, 2007.

VALERGA, J., RETA, M., LANARI, M. C. Polyphenol input to the antioxidant activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts. **Food sci technol**, v. 45, p. 28-35, 2012.

VAN CROMPHAUT, S. J., VANHOREBEEK, I. and VAN DEN BERGHE, G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. **Curr Pharm Des**, v. 14, p. 1887–1899, 2008.

VARLEY, H.; GOWENLOCK, A.H.; BELL, M. Practical Clinical Biochemistry. In: Heinemann IW, (5th edn), Medical Books Ltd, London, UK, 1976.

VAUZOUR, D. et al. Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action. **Nutrients**, v. 2, p. 1106 - 1131, 2010.

VERDI, L. G. et al. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-363, 2004.

VIVIAN, E. M. Dapagliflozin: A new sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor for treatment of type 2 diabetes. **Am J Health-Syst Pharm**, v. 72, p. 361-372, 2015.

VLISSARA, H.; PALACE, M. R. Diabetes and advanced glycation end products. **J Intern Med**, v. 251, p. 87-101, 2002.

WAN, Y. et al. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. **Am J Clin Nutr**, v. 74, p. 596-602, 2001.

WANG, S.M.; MUSCAT, G.E.O. Nuclear receptors and epigenetic signaling- novel regulators of glycogen metabolism in skeletal muscle. **IUBMB**, v. 65, p. 657-664, 2013.

WATSON, R.T.; PESSIN, J.E. Subcellular compartmentalization and trafficking of the insulin-responsive glucose transporter, GLUT4. **Exp Cell Res**, v. 271, p. 75-83, 2001.

WATSON, R. T.; PESSIN, J. E. GLUT4 translocation- The last 200 nanometers. **Cell Signal**, v. 19, p. 2209–2217, 2007.

WEIR, G. C. et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. **Diabetes**, v. 50, p. 154-159, 2001.

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

WILKINSON, S. E.; PARKER, P. J.; NIXON, J. S. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. **Biochem J**, v. 294, p. 335-337, 1993.

WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, p. 48-57, 2013.

WILSON, E. G.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Valoración de las xantinas presentes en el matecocido al estilo rioplatense. **Revista Farmacêutica**, v. 124, p. 41, 198

WOLLHEIM, C. B.; SHARP, G. W. G. Regulation of Insulin Release by Calcium. **Physiol Rev**, v. 61, p. 914-973, 1981.

WRIGHT, E. M. et al. Surprising versatility of Na<sup>+</sup>-glucose cotransporters: SLC5. **Physiology (Bethesda)**, v. 19, p. 370-376, 2004.

WRIGHT, E. M.; MARTÍN, M. G.; TURK, E. Intestinal absorption in health and disease sugar. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 17, p. 943-56, 2003.

WU, C. H.; YEN, G. C. Inhibitory Effect of Naturally Occurring Flavonoids on the Formation of Advanced Glycation End products. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 3167-3173, 2005.

WU, F. et al. Flavonoid compound for preventing and treating diabetes and medicament application thereof. **China patent CN 102151281 A**, 2011.

ZAHARIEVA, D.P.; RIDDELL, M. C. Caffeine and glucose homeostasis during rest and exercise in diabetes mellitus. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 38, p. 813-822, 2013.

ZANATTA, L. et al. Effect of crude extract and fractions from *Vitex megapotamica* leaves on hyperglycemia in alloxan-diabetic rats. **J Ethnopharmacol**, v. 109, p. 151-155, 2007.

ZAREBA, G. et al. Phytotherapies for diabetes. **Drug Future**, v. 30, p. 1253-1282, 2005

ZIERATH, J. R.; KAWANO, Y. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, p. 385-398, 2003.

ZOIS, E.C.; FAVARO, E.; HARRIS, A. L. Glycogen metabolism in cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 92, p. 3-11, 2014.

YAMADA, C.B.S. Fitoterapia sua história e importância. **Racine**, p. 50-51, 1998.

YI, P.; PARK, J.; MELTON, D. A. Betatrophin: A Hormone that Controls Pancreatic beta-Cell Proliferation. **Cell**, v. 153, p. 1-12, 2013.