



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JEMIMA CORDEIRO MESSIAS MALCHER MIRANDA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDIABÉTICA
DA NANODISPERSÃO DE UMA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA DE *Baccharis
reticularia***

MACAPÁ-AP
2018

JEMIMA CORDEIRO MESSIAS MALCHER MIRANDA

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDIABÉTICA
DA NANODISPERSÃO DE UMA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA DE *Baccharis
reticularia***

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

Orientador: Emerson Augusto Castilho Martins.

MACAPÁ-AP
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborado por Mara Patrícia Corrêa Garcia – CRB-2/1248

Miranda, Jemima Cordeiro Messias Malcher

Investigação molecular do mecanismo de ação antidiabética da nanodispersão de uma fração flavonoídica de *Baccharis reticularia* / Jemima Cordeiro Messias Malcher Miranda; orientador, Emerson Augusto Castilho Martins – Macapá, 2018.

75 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

1. Diabetes. 2. Flavonoides – Compostos químicos. 3. Plantas medicinais. I. Martins, Emerson Augusto Castilho, orientador. II. Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.35 M672i

CDD. 22 ed.

**INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DO MECANISMO DE AÇÃO ANTIDIABÉTICA
DA NANODISPERSÃO DE UMA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA DE *Baccharis
reticularia***

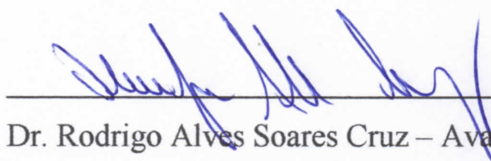
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em 06 de Julho de 2018

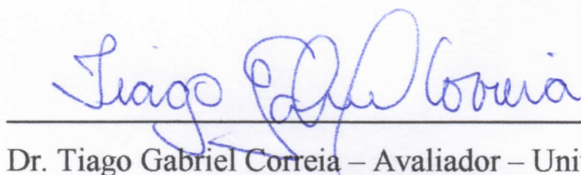
BANCA EXAMINADORA



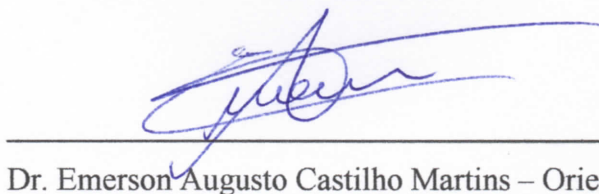
Dr^a. Francineide Pereira da Silva Pena – Avaliadora – Universidade Federal do Amapá



Dr. Rodrigo Alves Soares Cruz – Avaliador – Universidade Federal do Amapá



Dr. Tiago Gabriel Correia – Avaliador – Universidade Federal do Amapá



Dr. Emerson Augusto Castilho Martins – Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Senhor Jesus, porque dEle, por meio dEle e para Ele são todas as coisas. Aos meus pais, José Luiz e Benedita, por plantarem em mim a força de ir sempre além de onde eu estou. À minha irmã Quezia, que me carrega incansavelmente em seus braços de oração. Aos meus filhos Ricardo e Levi, que mesmo em tenra idade me ensinaram o significado da palavra superação. E por fim, a todas as pessoas com diabetes, pois apesar de ainda não termos alcançado os “finalmente”, essa pesquisa se moveu em prol disso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque nEle vivemos, nos movemos e existimos.

À Universidade Federal do Amapá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade proporcionada.

Ao orientador professor Emerson Martins por sua paciência, por confiar, por investir em mim, me ensinar, por me permitir fazer, errar, aprender, decidir, por me corrigir e por acreditar que ao concluir esse trabalho, eu estaria cientificamente, como estou, melhor do que quando começamos. Professor Emerson, seu esforço, determinação, amor pelo ensino, pela ciência e compromisso com os seus alunos são marcas que deixas por onde andas. Obrigada por elas.

Ao amigo Diego Quaresma que esteve ao meu lado durante toda essa caminhada, me incentivando a prosseguir, transbordando desmedidamente sobre mim o seu conhecimento acadêmico e científico. Amigo, você irradia luz, amor por tudo o que faz, competência e generosidade; como é bom estar ao seu lado.

À professora Francineide Pena pelo trabalho inspirador desenvolvido no Programa de Promoção da Saúde de Pessoas com Diabetes Mellitus. Toda essa teoria fez muito mais sentindo quando foi aliada à prática desenvolvida em seu projeto de extensão (e amor) com essas pessoas.

À equipe do Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular, onde realizei os experimentos, pelo partilhar sem egoísmo do conhecimento científico, pela não competitividade doentia que assola a muitos ambientes de trabalho. Por ser uma família que sabe sorrir e chorar junto, consolar e aconselhar. Que esse viver harmônico perdure e se propague sempre e em todo lugar.

Ao Laboratório de Pesquisa em Fármacos, onde foi realizada a etapa de coleta das amostras, bem como ao colega Hady Keita por me ajudar a realizá-la.

Ao Laboratório de Nanobiotecnologia Fitofarmacêutica pela parceria firmada para a realização dessa pesquisa.

*Ó profundidade da riqueza, tanto da sabedoria
como do conhecimento de Deus!*

*Quão insondáveis são os seus juízos, e quão
inescrutáveis, os seus caminhos!*

*Quem, pois, conheceu a mente do Senhor? Ou
quem foi o seu conselheiro? Ou quem primeiro
deu a Ele para que lhe venha a ser restituído?*

*Porque dEle, e por meio dEle, e para Ele são
todas as coisas.*

A Ele, pois, a glória eternamente. Amém

Livro de Romanos: 11:33-36 – Bíblia Sagrada

RESUMO

Introdução: O *Diabetes Mellitus* é uma síndrome metabólica que altera a homeostasia do metabolismo dos carboidratos, refletindo no metabolismo dos lipídeos e das proteínas. Caracteriza-se por hiperglicemia em jejum resultante da deficiência na produção de insulina e/ou da diminuição da sua ação tecidual. O tratamento alternativo do diabetes por meio da medicina popular com o uso de plantas tem gerando muitas pesquisas que servem como base para a produção de novos fármacos. Isso porque há plantas que apresentam substâncias com ação antidiabética, como por exemplo, a *Baccharis reticularia* DC., que é rica em flavonoides com efeito antioxidante, destacando-se por isso como uma planta medicinal candidata ao tratamento do diabetes. Para isso, são necessárias técnicas que, dentre outros, possibilitem o isolamento e a identificação dessas substâncias; que determinem o uso correto, os efeitos adversos, bem como o mecanismo de ação molecular. Este último, por exemplo, pode ser avaliado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real, que quantifica a expressão gênica diante de um determinado tratamento. **Objetivo:** investigar o mecanismo de ação da nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia*, avaliando a expressão gênica de algumas enzimas hepáticas, da insulina e do cotransportador de sódio e glicose, presentes nos tecidos hepático, pancreático e renal, respectivamente. **Método:** As amostras dos tecidos fígado, pâncreas e rim foram coletadas de ratos com diabetes induzido por aloxano, não tratados e tratados com a nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia*. Então das amostras foi feita a extração do RNA, seguida da síntese de cDNA para verificar a quantificação relativa da expressão gênica dos alvos, por PCR em tempo real. **Resultados:** os resultados das avaliações da expressão gênica foram obtidos com sucesso, comprovando a eficiência da amplificação dos *primers* de todos os alvos, embora não tenhamos conseguido encontrar alteração na expressão gênica nos alvos testados. **Conclusão:** Sugere-se a continuação do estudo através da avaliação de outros possíveis alvos para que se possa identificar o mecanismo de ação antidiabética da nanodispersão preparada a partir da fração flavonoídica de *B. reticularia*.

Palavras-chave: Diabetes. Plantas medicinais. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Introduction: *Diabetes mellitus* is a group of metabolic diseases that changes primarily the homeostasis of carbohydrate metabolism followed by changes in lipidic and protein metabolisms. It is characterized by insulin action inefficacy as a consequence of its reduced production and/or its tissue resistance, causing hyperglycemia in fasting. In a previous study evaluating a nanodispersion of flavonoic fraction isolated from *Baccharis reticularia* DC. applied in aloxan-diabetic rats it was possible to show the efficiency of this treatment in reducing the diabetes. **Objective:** The aim of this work is to evaluate changes in gene expression by Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) as a way of elucidate the mechanism of action from this nanodispersion in glucose`s reducing in aloxan-diabetic rats. **Methods:** We have chose some enzymes related to glucose metabolism, of the insulin and sodium-glucose cotransporter as targets in liver, pancreas and kidney respectively. **Results:** It was possible to quantify all the targets used, however we could not find any significant change in gene expression of the selected targets. **Conclusion:** We suggest the investigation of another targets in a future study as a way of elucidate the biological function of flavonoic nanodispersion from *B. reticularia* in reducing diabetes in rats.

Key words: Diabetes. Mechanism of action. Real-time Polymerase Chain Reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Fisiopatologia do diabetes..... 18
- Figura 2** – Desenhos dos *primers* para amplificação das enzimas PEPCK-I, FBP-I e G6Pase, do hormônio insulina e do cotransportador renal SGLT2, demonstrando os éxons do mRNA (verde), a região de cada *primer* (cinza) e dentro dela, a sequência específica do *primer* (vermelho), e ainda as enzimas de restrição e seus respectivos pontos de corte. (A) *primers* da PEPCK1; (B) *primers* da FBP1; (C) *primers* da G6Pase; (D) *primers* da Insulina e (E) *primers* do SGLT2..... 48
- Figura 3** – (A) Curva padrão de amplificações por PCR em tempo real por *primer* do gene da beta-actina, em 5 concentrações diferentes (diluição seriada de 1:5 com cDNA de fígado) de cDNA obtido a partir de transcrição reversa de mRNA extraído de fígado de ratos (*Rattus norvegicus*). (B) Plot de amplificação demonstrando a constância espacial entre as três repetições técnicas e entre as cinco diluições. (C) Gráfico da curva de *Melting* com pico único indicando a amplificação de um produto específico. 50
- Figura 4** – Curvas Padrão de amplificações por PCR em tempo real utilizando-se os *primers* dos genes (A) PEPCK-I, (B) FBP-I, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando os valores de R^2 e eficiência..... 52
- Figura 5** – Plot de amplificação dos *primers* dos genes (A) PEPCK-I, (B) FBP-I, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando a constância espacial entre as réplicas técnicas e as cinco diferentes diluições..... 53
- Figura 6** – Curva de *Melting* dos amplicons dos genes (A) PEPCK1, (B) FBP1, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando pico único indicativo de amplificação de produto específico..... 54
- Figura 7** – Gráfico da quantificação relativa (\log_2RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de fígado para avaliar a expressão gênica das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK1), Glicose-6-fosfatase (G6Pase) e frutose-1,6-bifosfatase (FBP1)..... 57
- Figura 8** – Gráfico da quantificação relativa (\log_2RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de pâncreas para avaliar a expressão gênica da insulina (INS)..... 59
- Figura 9** – Gráfico da quantificação relativa (\log_2RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da

média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de rim para avaliar a expressão gênica do cotransportador de sódio e glicose (SGLT2). 61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Quadro 1** – Dez reações enzimáticas da gliconeogênese, das quais sete são comuns a glicólise e as demais são exclusivas da gliconeogênese (marcadas em azul) 30
- Quadro 2** – Principais classes de flavonoides com os seus principais representantes e fontes..
..... 40
- Quadro 3** – Ações terapêuticas de alguns flavonoides..... 41
- Quadro 4** – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada enzima alvo, com a temperatura de *Melting* teórica, temperatura de associação usada para cada par e código de acesso GenBank da sequência utilizada para o desenho do iniciador. 45
- Quadro 5** – Especificidades de cada *primer* escolhidas na etapa de desenho dos *primers*.... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
ADP	Adenosina Difosfato
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
Anti-GAD	Antidescarboxilase do Ácido Glutâmico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ct	Cycle Threshold
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido Desoxinucleotídeo
DNT	Diabético Não Tratado
DPP-4	Dipeptidil-Peptidase-4
DT	Diabético Tratado
EGGG	Epigallocatequina galato
FPB-1	Frutose-1,6-Bifosfatase-1
G6P	glicose-6-Fosfato
G6Pase	Glicose-6-Fosfatase
GCK	Glicoquinase
GDM	Diabetes Gestacional
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GLUTs	Transportadores de Glucose
Glys2	Glicogênio Sintase
GP	Glicogênio Fosforilase

IDE	Insulin Degrading Enzyme
IDF	International Diabetes Federation
Ins	Insulina
IRS	Substrato do Receptor de Insulin
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEPCK	Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Cinase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	Ácido Ribonucleotídeo
RT	Reverse Transcription
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SGLT	Sodium/glucose Cotransporter
SUR	Sulfonylurea Receptor
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS.....	15
1.1.1 Objetivo geral.....	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 DIABETES.....	17
2.2 EQUILÍBRIO ENERGÉTICO	21
2.2.1 Glicose.....	21
2.2.1.1 <i>Regulação do transporte de Glicose</i>	22
2.3 PÂNCREAS	23
2.3.1 Insulina – hormônio pancreático.....	24
2.3.1.1 <i>Secreção da Insulina</i>	24
2.3.1.2 <i>Receptor de insulina</i>	25
2.3.1.3 <i>Sinalização insulínica</i>	25
2.3.1.4 <i>Resistência insulínica</i>	26
2.4 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO HEPÁTICO	26
2.4.1 Fígado	26
2.4.1.1 <i>Glicólise</i>	27
2.4.1.2 <i>Glicogênese e Glicogenólise</i>	27
2.4.1.3 <i>Gliconeogênese</i>	29
2.5 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO RENAL DA GLICOSE.....	31
2.6 TRATAMENTO DO DIABETES.....	31
2.6.1 Terapias de referência no tratamento da diabetes	31
2.6.2 Plantas medicinais com efeito hipoglicemiante.....	33
2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL UTILIZADA NA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DOS EFEITOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	38

2.7.1 PCR quantitativa em tempo real.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 COLETA DO MATERIAL PARA ANÁLISE	42
3.2 ENSAIOS COM ÁCIDOS NUCLEICOS	42
3.2.1 Extração de RNA	42
3.2.2 Síntese de DNA complementar – Transcrição Reversa (do inglês <i>Reverse Transcription</i>, RT).....	43
3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (do inglês, <i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>, RT-qPCR).....	44
3.3 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL	44
3.3.1 Desenho de <i>primers</i>	44
3.3.2 Curva padrão	45
3.3.3 Quantificação relativa do mRNA	46
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i>	47
4.2 VALIDAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	50
4.3 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	56
4.3.1 Análise de mRNA de fígado.....	56
4.3.2 Análise de mRNA de pâncreas	58
4.3.3 Análise de mRNA do rim	60
4.4 AÇÃO ANTIDIABÉTICA DAS PLANTAS.....	61
5 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus (DM), popularmente conhecido como diabetes, é uma condição crônica que se caracteriza por um nível de glicose elevado no sangue, (hiperglicemia), causado pela incapacidade do organismo de produzir, ou de produzir suficientemente, o hormônio insulina, bem como de utilizá-lo eficazmente, devido à resistência tecidual a ele (DEFRONZO et al, 2015). Nas últimas três décadas, o diabetes tem apresentado um aumento alarmante de sua prevalência e da morbimortalidade, que compromete a qualidade de vida das pessoas acometidas por ele (GOMES; COBAS, 2011; International Diabetes Federation, 2017).

Atingindo proporções pandêmicas, o diabetes é considerado uma emergência clínica para o século XXI e um grave problema de saúde que afeta todos os países, independente do seu grau de desenvolvimento, apesar das inúmeras estratégias e ferramentas atualmente disponíveis para o seu combate. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) no ano de 2000, Brasil teria 4,6 milhões de pessoas com essa patologia e 11,3 milhões em 2030, tomando por base um estudo feito no Brasil em 1988 por Malerbi e Franco, que pela realização de um inquérito em nove capitais, evidenciou a prevalência de 7,6% de diabetes em adultos de 30 a 69 anos. Esses resultados foram tomados como referência para descrever a prevalência de diabetes, não apenas pela OMS como também por outras pesquisas epidemiológicas (PENA, 2017; SCHMIDT et al, 2011). Já a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2017) estima que até 2045 o quantitativo de adultos com diabetes será de aproximadamente 628,6 milhões em todo o mundo. Já no Brasil, essa projeção é de aproximadamente 23,3 milhões, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (35,1 milhões), Índia (123,5 milhões) e China (150,7 milhões).

Do seu controle resultam, dentre outros, na redução das hospitalizações e das mortes em consequência de complicações crônicas (ALFRADIQUE, 2009). Segundo os dados relativos aos custos econômicos publicados pela IDF em 2017, o investimento nos serviços de saúde (preventivos e curativos) para adultos com diabetes é em média duas a três vezes maior do que para aqueles sem diabetes, o que gera um significativo impacto econômico tanto para as pessoas com diabetes e seus familiares, quanto para os países e seus sistemas de saúde. Em todo o mundo, os gastos com essas pessoas cresceram de US\$ 232 bilhões em 2007 para US\$ 727 bilhões em 2017. A projeção é que haja um aumento de 7% desses gastos no período entre 2017 a 2045, o que representa o alcance de US\$ 776 bilhões. No ranking de dez países

que mais investiram em saúde para adultos com diabetes em 2017, o Brasil ocupa a 6ª posição, com um investimento de U\$ 28 bilhões (IDF, 2017).

Contudo, além desses, e dos custos sociais relacionados com a perda da produtividade precoce, há os custos individuais relativos a dor, a ansiedade e a inconveniência, que são intangíveis e imensuráveis, mas significativos quanto a diminuição da qualidade de vida (BRASIL, 2006).

A OMS (2002) considera como fatores de risco para o diabetes, dentre outros, a obesidade, o sedentarismo, as mudanças socioculturais, o aumento da expectativa de vida e o estilo de vida desprovido de qualidade. Sobre isso, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2017) preconiza que o controle desses fatores de risco, com a consequente melhoria na qualidade de vida das pessoas com diabetes, está relacionado à adoção de hábitos saudáveis e ao aumento da atividade física.

A essas mudanças deve-se agregar a terapia farmacológica que inclui a insulina exógena e a administração de antidiabéticos como os sensibilizadores, os secretagogos, os inibidores das enzimas α -glicosidase, α -amilase e DPP-4 (do inglês, dipeptidil-peptidase-4), os inibidores do cotransportador de sódio/glicose, os agonistas do receptor de GLP-1 (do inglês, glucagon-like peptide-1) e os análogos do hormônio GLP-1, podendo ser esses fármacos utilizados em monoterapia ou em associação (VAREDA et al, 2014). Contudo, a adesão ao tratamento dos fármacos de referência por vezes é comprometida na ocorrência de algum desvio dos efeitos benéficos, custo elevado ou ainda efeitos colaterais como hipoglicemia, ganho de peso, distúrbios gastrintestinais, edemas e indução de resistência à insulina (VASCONCELOS et al, 2011).

Anteriormente ao surgimento da insulina exógena e dos antidiabéticos de referência, as plantas medicinais eram o recurso natural disponível para o tratamento de diversas patologias. Ainda hoje, mesmo com o advento dos tratamentos de referência para tratar o diabetes, há pessoas que seguem a prescrição médica, associando a ela preparados que derivam de plantas. Isso porque muitas plantas foram tidas como medicinais, ainda que sem comprovação científica até o momento, pela prevalência da dita “sabedoria popular” que desconhece os eventos biológicos, mas garante algum ou completo alívio dos sinais e sintomas dessa doença. De fato, muitas delas apresentam em sua constituição substâncias que geram respostas biológicas diante de doenças quando introduzidas no organismo animal, incluindo o homem. Contudo, a segurança do uso deve ser garantida pela comprovação científica da presença de metabólitos favoráveis ao tratamento das doenças (SOUSA et al, 1991; BOSCOLO; VALLE, 2008). Essa comprovação se tornou possível com o

aprimoramento biotecnológico que possibilita aos pesquisadores submeter as plantas medicinais à investigação científica por meio de técnicas que investigam suas ações biológicas e que confirmam seus efeitos curativos e/ou preventivos (KUMAR et al, 2012).

Negri (2005) em sua revisão sobre diabetes e plantas medicinais cita alguns mecanismos de ação antidiabética de plantas medicinais como, por exemplo, o estímulo ao aumento da microcirculação do sangue no organismo; a resistência aos hormônios que aumentam a taxa de glicose; o aumento do estímulo e da liberação de insulina; o aumento do número e da sensibilidade do sítio receptor de insulina; o aumento do consumo de glicose nos tecidos e órgãos. De acordo com Abdel-Hassan et al (2000), dentre as substâncias ativas com ação antidiabética que já foram identificados nos testes com plantas medicinais destacam-se: glicosídeos, taninos, flavonoides, esteroides, terpenóides. Ainda assim, embora haja uma vasta literatura com informações sobre essas substâncias encontradas nas plantas medicinais, além da etnobotânica que registra a existência de muitas destas no mundo com potencial antidiabético, poucas são as espécies que tiveram a comprovação de sua aplicação terapêutica e que preencheram os requisitos que autorizam o seu uso comercial (NEGRI, 2005; VOLPATO et al, 2002).

A pesquisa sobre as plantas medicinais se move por meio de tecnologias que, dentre outras, avaliam suas propriedades biologicamente ativas e quantificam a resposta gênica diante de um tratamento, para garantir o uso eficaz e seguro das plantas medicinais. Esse tipo de pesquisa resulta em contribuições significativas, que dão início à investigação de novos fármacos como mais uma opção ao tratamento convencional. Assim, a investigação do mecanismo de ação antidiabética de uma espécie que apresenta essa propriedade serve como justificativa para essa pesquisa, pois seus resultados podem subsidiar outras que favoreçam o seu uso como fitoterápico ou como modelo para novos fármacos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar, por meio da técnica de Amplificação em Cadeia da Polimerase em tempo real, o mecanismo de ação antidiabética da nanodispersão de uma fração flavonoídica de *Baccharis reticularia* utilizada no tratamento de ratos com diabetes induzida por aloxano.

1.1.2 Objetivos específicos

Quantificar a expressão gênica das enzimas hepáticas fosfoenolpiruvato carboxiquinase I, frutose-1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase de ratos com diabetes induzido

por aloxano, não tratados e tratados com a nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia*.

Quantificar a expressão gênica da insulina de ratos com diabetes induzido por aloxano não tratados e tratados com a nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia*.

Quantificar a expressão gênica do cotransportador de sódio e glicose renal SGLT2 de ratos com diabetes induzido por aloxano, não tratados e tratados com a nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia*.

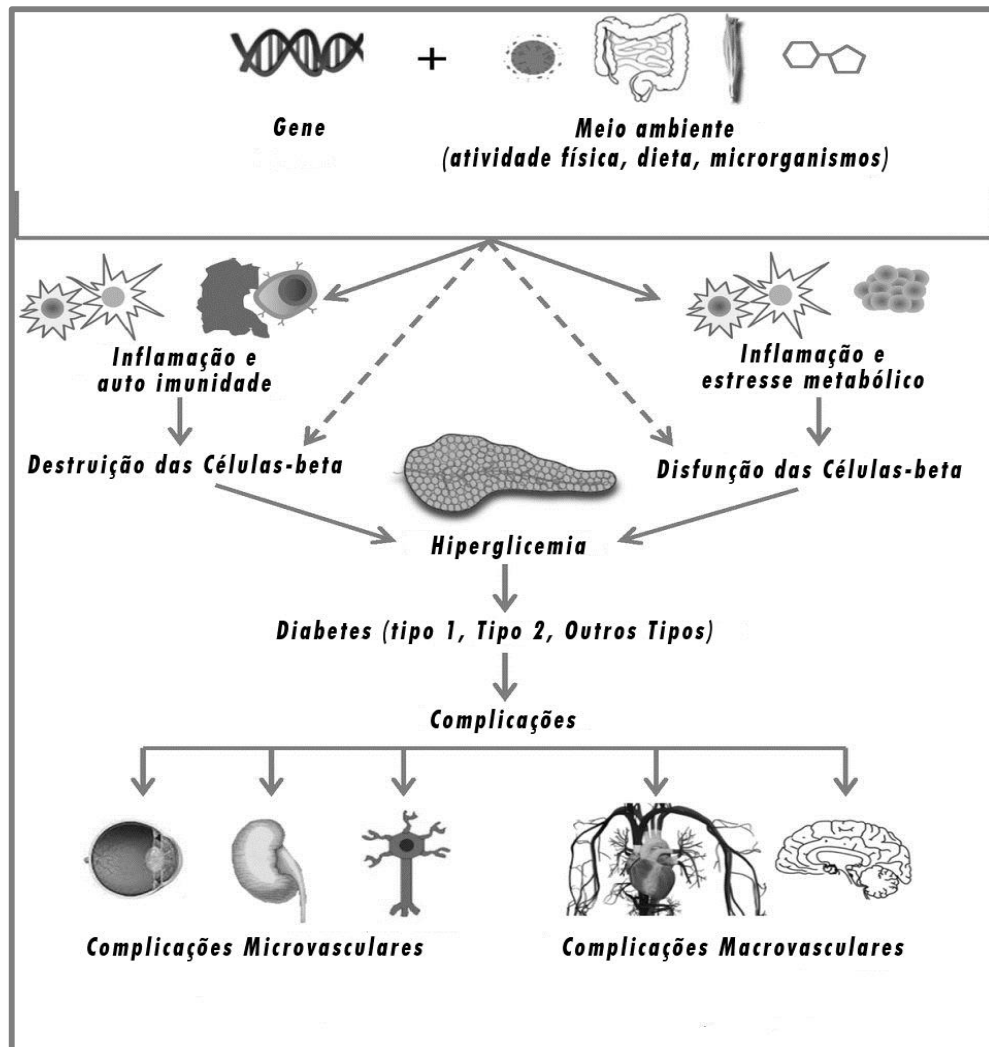
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES

A Organização Mundial da Saúde define o diabetes como um distúrbio metabólico resultante da produção e/ou ação deficiente de insulina, o que eleva cronicamente a glicose no sangue (hiperglicemia) comprometendo o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas (WHO, 1999). Esse foi o entendimento tomado como referência também pelo Ministério da Saúde Brasileiro ante as suas abordagens sobre o tema (BRASIL, 2015). Martins (2000) corrobora com esse conceito acrescentando que o diabetes ocorre pela falta ou ineficácia da ação da insulina, que é um hormônio produzido pelo pâncreas endócrino, o que conseqüentemente afeta o modo pelo qual o organismo utiliza a glicose. Golan (2009) definiu o diabetes do mesmo modo e contribuiu com este conceito ao diferenciar o diabetes mellitus do diabetes insípido, no qual a reabsorção renal de água é inibida devido a desregulação da resposta ao hormônio antidiurético, resultando em elevada produção de urina diluída. Apesar de ambos apresentarem esse sintoma em comum, não existe entre eles relação etiológica.

Os fatores de risco, tanto genéticos quanto ambientais, associados ou não, produzem alterações fisiológicas como inflamação, autoimunidade e estresse metabólico. Essas alterações provocam a destruição das células beta e/ou a sua disfunção, comprometendo a síntese e a secreção de insulina, resultando na hiperglicemia, que é o fator em comum característico de todos os tipos de diabetes (Figura 1). A cronicidade da hiperglicemia provoca complicações que estão categorizadas como distúrbios microvasculares e macrovasculares e destes resultam doenças cerebrovasculares, cardiovasculares, retinopatias, nefropatias e amputações não traumáticas, tanto dos membros inferiores quanto dos superiores. A primeira causa de mortalidade em indivíduos com diabetes tipo 2 é a doença cardiovascular, enquanto que a retinopatia é o principal motivo de cegueira. Já a nefropatia é a principal causa que leva esses indivíduos à programas de diálises e o pé diabético é o principal responsável por amputações dos membros inferiores. Além desses, há a responsabilização do diabetes na influência, direta ou indireta, de agravos aos sistemas musculoesquelético e digestório, à função cognitiva, à saúde mental, bem como a associação a diversos tipos de câncer. Uma intervenção terapêutica personalizada e intensiva utilizada na prevenção ou no tratamento das complicações advindas do diabetes, se bem sucedida, pode diminuir o risco de morbimortalidade associado a essa patologia (GREGG et al, 2016; JOHNSTON et al, 2017; SBD, 2017; SKYLER et al, 2017).

Figura 1 – Fisiopatologia do diabetes



FONTE: Adaptado de SKYLER et al 2017, (p. 242)

O tratamento adequado do diabetes depende da correta classificação e esta, antes fundamentada no tipo de tratamento, hoje toma por base a etiologia, tendo por isso caído em desuso os termos *diabetes mellitus insulino dependente* e *diabetes mellitus insulino independente*. Atualmente segue-se a classificação proposta em 1998 pela ADA (*American Diabetes Association*) e em 1999 pela OMS, que classifica o diabetes em Tipo 1, Tipo 2, Diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes (ADA, 2017; SKYLER et al, 2017).

O diabetes mellitus tipo 1 (ou DM1) é uma desordem autoimune mediada por autoanticorpos circulantes como o antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD), o anti-ilhotas, o anti-insulina e o antígeno insulinoma “like” que levam a destruição das células responsáveis pela síntese de insulina, as células beta, progredindo para um estágio de deficiência completa desse hormônio. Essa deficiência é compensada com a administração

diária de insulina exógena, garantindo a homeostasia da glicose. Corresponde entre 5 a 10% do total dos casos de diabetes e subdivide-se em diabetes tipo 1 autoimune ou tipo 1A e diabetes tipo 1 idiopático ou tipo 1B. No tipo 1A, a resposta autoimune pode ser desencadeada por fatores ambientais, bem como pela suscetibilidade genética, e o diagnóstico é confirmado ante a positividade de um ou mais autoanticorpos circulantes. Ao tipo 1B atribui-se os casos nos quais há a ausência de detecção de autoanticorpos circulantes, mas sem a exclusão da insulino-terapia plena (BAEKESKOV, 1990; LAN, 1996; MS, 2013).

O diabetes mellitus tipo 2 (ou DM2), assim como o diabetes mellitus tipo 1, é um distúrbio poligênico que resulta da associação entre predisposição genética e fatores ambientais desfavoráveis, caracterizando-se por resistência tecidual à insulina com a consequente diminuição da absorção de glicose pelas células. Inicialmente, a compensação dessa diminuição se dá pelo aumento agudo da secreção de insulina, o que sobrecarrega o pâncreas, levando a deterioração das células beta, ocorrendo com isso a deficiência relativa na secreção de insulina, instalando no organismo um estado de hiperglicemia que nem sempre é revertido, mesmo com o uso da terapia antidiabética (SZKUDELSKI, 2012; GUYTON, 2017). Ainda não foram definidas etiologias específicas do diabetes tipo 2, contudo é sabido que há uma relação direta com pessoas obesas ou que apresentam sobrepeso, visto que o excesso de peso por si provoca resistência à insulina. Além disso, mulheres que desenvolveram diabetes no período gestacional, pessoas hipertensas e as que apresentam dislipidemia, bem como alguns subgrupos étnicos (afro-americanos, americanos indianos, hispânicos/latinos) estão mais suscetíveis ao diabetes tipo 2 (ADA, 2017).

Em 2015, no Simpósio de Pesquisa promovido pela ADA objetivando definir abordagens terapêuticas apropriadas com base na fisiopatologia e no estágio da doença foi abordado, dentre outros, sobre os determinantes genéticos e ambientais de risco do diabetes tipos 1 e 2, visto que nestes a perda progressiva de massa e/ou a disfunção das células beta resulta em hiperglicemia, que quando já estabelecida conduz às complicações clínicas comuns a todos os tipos de diabetes, diferenciando-se, contudo na sua progressão. A caracterização dos fatores que levam à perda das células beta ou à sua disfunção e a definição de fenótipos e genótipos dos subtipos de diabetes são primordiais para a promoção de uma terapia individualizada (SKYLER et al, 2017).

Um tipo pouco conhecido, mas similar ao diabetes tipo 2 é o Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) que ocorre durante a gravidez devido às mudanças inerentes desta, como as hormonais e as metabólicas, associadas aos fatores genéticos e ambientais. Já em idade

fértil, muitas mulheres alcançaram a obesidade, aumentando o risco de desenvolver diabetes tipo 2. Por vários anos, qualquer quadro de intolerância à glicose ou mesmo de diabetes tipo 2 não diagnosticado, descoberto na gravidez era considerado como DMG sem a consideração dessa condição ter antecedido a gravidez. Atualmente, na tentativa de contornar essa limitação, as gestantes diagnosticadas com diabetes no primeiro trimestre são classificadas como tendo diabetes pré-gestacional preexistente, sendo diabetes tipo 2 ou excepcionalmente diabetes tipo 1. Já o diabetes diagnosticado pela primeira vez a partir do segundo trimestre de gravidez é considerado como DMG. Isso porque na gravidez há a produção de hormônios pela placenta contribuindo para um quadro de resistência insulínica que perdura nesse período. Mulheres obesas com histórico familiar de diabetes têm maior tendência a desenvolvê-lo quando grávidas. Contudo a tendência na maioria dos casos é seu desaparecimento após o período gravídico. Apesar disso, essas mulheres ficam mais propensas ao desenvolvimento futuro de diabetes tipo 2 (ADA, 2012; ADA, 2017).

Na classificação *Outros Tipos de diabetes* estão alocadas as formas monogênicas que a depender daquilo que provocou a alteração glicêmica tem-se a apresentação clínica. Há pelo menos alguns tipos que subdivididos representam os menos comuns de diabetes. Segundo a Diretriz da SBD (2017) e Maraschin (2010) eles são:

- ✓ Defeitos genéticos na função da célula beta: abarca dentre outros a forma MODY (do inglês *Maturity-Onset Diabetes of the Young*) que se caracteriza, dentre outros, por apresentar graus variáveis de disfunção das células beta, tendo sido identificados pelo menos 13 subtipos;
- ✓ Defeitos genéticos na ação da insulina que ocorre pela mutação gênica do receptor de insulina;
- ✓ Doenças do pâncreas exócrino resultante de pancreatite ou pancreatectomia ou carcinoma no pâncreas;
- ✓ Endocrinopatias pelo aumento de hormônios envolvidos na contraregulação da insulina;
- ✓ Indução por medicamentos que alteram o metabolismo da glicose, diminuindo ou a secreção ou a ação da insulina;
- ✓ Síndromes genéticas associadas ao diabetes como de Down, Turner, Prader Willi;
- ✓ Infecções como rubéola congênita, citomegalovírus;
- ✓ Formas imunológicas incomuns que ocorrem devido a anticorpos anti-receptor da insulina.

Duas outras categorias, a glicemia de jejum alterada e a tolerância à glicose diminuída, não são entidades clínicas, mas são reconhecidas como condição de pré-diabetes. Ambas são consideradas fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes e de doenças cardiovasculares (SBD, 2015).

2.2 EQUILÍBRIO ENERGÉTICO

O consumo de alimentos oportuniza ao organismo obter e estocar nutrientes energéticos necessários ao desenvolvimento das suas funções vitais. No jejum, esse estoque é mobilizado para que não se interrompa o fornecimento de energia ao organismo, garantida principalmente por meio de três substratos: carboidratos (glicose), lipídeos e proteínas. O processamento desses substratos resulta em trifosfato de adenosina (ATP) que é a forma de transferência de energia dos alimentos para as células, sendo por isso chamado de “moeda” energética do metabolismo celular (GUYTON, 2011; ORIÁ; BRITO, 2016).

2.2.1 Glicose

A glicose é um dos combustíveis energéticos indispensáveis para o funcionamento do organismo, de uso ininterrupto, mas de aquisição intermitente por meio da ingestão de alimentos. Esse aparente desequilíbrio é corrigível porque geralmente o consumo de alimentos ocorre em quantidades calóricas acima do necessário. No período pós prandial, o organismo utiliza a glicose na via glicolítica para produção de energia e armazena o excedente para uso em períodos de jejum (KAHN et al, 2009). Esse armazenamento se dá em forma de glicogênio no fígado, para uso extra-hepático e no músculo esquelético para consumo próprio. O glicogênio é um polissacarídeo constituído por unidades de glicose unidas por ligações α -1,4. Esse agrupamento é linear, em número de oito a doze resíduos, a partir de onde se bifurca por meio de ligações α -1,6, originando outros dois agrupamentos lineares. Além de glicogênio, outra forma de estoque da glicose é como triglicerídeos no tecido adiposo (DEAN, 2004).

O controle hormonal que induz o nível glicêmico no sangue à homeostase dá-se principal e alternadamente por meio da insulina e do glucagon, em períodos pós prandial e pós-absortivo (jejum), respectivamente. Esses hormônios atuam na maioria dos tecidos, porém mais acentuadamente no fígado, pâncreas, músculo esquelético e tecido adiposo. (DEAN, 2004; GUYTON, 2011). O glucagon reverte os efeitos da insulina, e vice versa, e além dele, outros hormônios também são tidos como contrarreguladores. São eles a norepinefrina, a epinefrina, os glicocorticoides e o hormônio do crescimento. Dessa forma, o

metabolismo da glicose envolve tanto processos anabólicos quanto catabólicos (GOLAN, 2009).

Segundo a ADA, a condição de normoglicemia se caracteriza com o valor de glicose sérica em jejum < 100 mg/dl, todavia esse diverge para menos daquele adotado pela OMS que é o de 110 mg/dl. Já o estado denominado de pré-diabetes ou risco aumentado para diabetes é aceito quando no jejum a glicose sérica se enquadra em valores ≥ 100 e < 126 mg/dl; enquanto que o estado de diabetes estabelecido, esse valor se encontra ≥ 126 mg/dl (WHO, 2016; ADA, 2017). O valor normal da glicose sérica em jejum pela manhã, antes do desjejum é mantido pela produção de glicose endógena. Após a ingestão de alimentos, esse valor aumenta para 120 a 140 mg/dl, ocorrendo então a necessidade de sua redução, pela absorção celular tanto para uso imediato quanto para armazenamento. Além da ingestão de alimentos (considerando a quantidade e tipo de carboidrato, e as taxas de digestão e absorção), o nível da glicose sérica aumenta pela quebra do glicogênio ou pela síntese de glicose hepática (GUYTON, 2011).

2.2.1.1 Regulação do transporte de Glicose

Por ser uma molécula hidrofílica, a glicose necessita de transportadores que facilitem sua locomoção para o citoplasma. Esse transporte é mediado por transportadores de glicose (GLUTs). Já se sabe da existência de pelo menos doze isoformas que estão distribuídas em todo o organismo conforme as especificidades dos tecidos. Isso é possível porque esses transportadores apresentam um padrão de expressão tecidual específico, apesar de serem homólogos em sua sequência primária. O GLUT1 é comum a muitos tecidos e se relaciona ao transporte basal de glicose, independente de insulina. O GLUT2 presente em órgãos como o pâncreas carrega a glicose para o interior das células beta, levando ao aumento da concentração intracelular proporcional a concentração extracelular desse nutriente. Dessa forma, junto com a enzima glicoquinase, responsável pela fosforilação da glicose no interior da célula, é tido como um sensor da presença de glicose na célula beta; também se encontra presente nos hepatócitos, para onde ocorre o influxo da glicose a fim de ser metabolizada, e na região basal da célula intestinal e do túbulo proximal renal, permitindo a reabsorção da glicose para o sangue. A expressão gênica dessa isoforma é inibida na condição de hiperinsulinemia. O GLUT3, junto com o GLUT1, está presente no sistema nervoso central, para onde se difunde a glicose sérica, independente da presença de insulina. Dessa forma, nos períodos em que a glicose proveniente dos alimentos está escassa e conseqüentemente não ocorre secreção de insulina, o organismo produz glicose endógena que circula no organismo

para prover os tecidos que a utilizam como principal ou única fonte de energia; não havendo nesse caso a competição pela captação de glicose por tecidos sensíveis a insulina. O GLUT4 encontra-se em tecidos responsivos a insulina, como o cardíaco, o muscular esquelético e o adiposo, por onde ocorre nesses dois últimos, a captação da glicose periférica. Diferente das outras isoformas que independem do sinal insulínico e estão presentes na membrana, o GLUT4 encontra-se em vesículas citoplasmáticas e tem o seu transporte, fusão na membrana plasmática e acoplamento mediados pelo sinal insulínico. A contração muscular estimula a transcrição e translocação de GLUT4 para a membrana, independente da disponibilidade insulina, possibilitando o aumento tanto da captação de glicose pelo músculo mesmo no período pós-exercício quanto da sensibilidade tecidual insulínica. Daí a recomendação de atividade física para indivíduos com resistência à insulina e diabetes tipo 2 (HAYASHI et al, 1997; TORTORA; GRABOWSKI, 2003; ULDRY; THORENS, 2004; KATZER, 2007; GUYTON, 2011)

Outro mecanismo de transporte de glicose através da membrana é mediado pelo cotransportador de sódio-glicose (SGLT) presente na região apical do intestino delgado e do túbulo proximal renal, em duas isoformas (SGLT1 e SGLT2). Nesse tipo de cotransporte, a glicose é absorvida contra uma diferença de concentração possibilitada pelo transportador, que possui, externamente à membrana, dois sítios de ligação, sendo um para cada elemento, transportando-os ao mesmo tempo para o interior celular. A energia para esse transporte provém do gradiente de concentração do sódio, que é mais elevado no exterior da célula; esse gradiente é mantido por uma bomba Na^+/K^+ (GUYTON, 2011).

2.3 PÂNCREAS

O pâncreas é uma glândula constituída por dois tipos principais de tecidos. Um deles é formado por células exócrinas que, organizadas em ácinos, correspondem a aproximadamente 95% da massa pancreática e são produtoras de enzimas digestivas. O outro tipo que se encontra disperso no parênquima exócrino são as ilhotas de Langerhans, formado por um aglomerado de células que têm função endócrina. As ilhotas são formadas por pelo menos seis tipos de células distintas entre si morfologicamente, sendo as principais alfa, beta, delta e células PP. As artérias esplênicas e pancreático duodenal conduzem o sangue ao pâncreas, enquanto que pela veia porta hepática ocorre a drenagem venosa, conduzindo ao fígado as altas concentrações de hormônios produzidos no pâncreas. As células alfa secretam dentre outros, o hormônio glucagon, e as células beta, insulina; as células delta liberam somatostatina e as células PP, polipeptídio pancreático. Nas ilhotas ocorre comunicação

intercelular, de modo que a inibição da secreção de alguns hormônios é feita por outros, a exemplo da inibição da secreção de glucagon que ocorre pela liberação de insulina (GOLAN, 2009; GUYTON, 2011; ORIÁ; BRITO, 2016)

2.3.1 Insulina – hormônio pancreático

A insulina é o principal hormônio responsável pelo armazenamento do excesso de glicose. Sintetizado nas células beta por estímulo de nutrientes, aminoácidos e lipídeos, sua molécula é constituída de duas cadeias A e B ligadas por pontes dissulfeto. Em condições normais há sempre um estoque de insulina disponível que responde imediatamente ao estímulo, como, por exemplo, um aumento no nível de glicose sérica. Contudo, a secreção não cessa por falta de insulina, que permanece com o nível constante nas células, pois a secreção é acompanhada da sua biossíntese. Desempenha um papel fundamental no aumento da captação periférica de glicose pelos tecidos sensíveis a insulina, como o muscular e o adiposo, no estímulo à síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, na inibição da degradação de proteínas e ácidos graxos, e da produção glicose endógena (DEAN, 2004; GOLAN, 2009; GUYTON, 2011; ORIÁ; BRITO, 2016).

A insulina circulante, com meia vida plasmática de aproximadamente 6 minutos, se liga ao receptor de insulina presente nas células alvo. Exceto a porção da insulina que se liga ao receptor de insulina, o restante dela é eliminado pela enzima de degradação da insulina IDE (do inglês, *insulin degrading enzyme*), também chamada de insulinase presente no fígado e no rim (GOLAN, 2009; GUYTON, 2011).

2.3.1.1 Secreção da Insulina

Visto que toda variação glicêmica é detectada pelas células beta pancreáticas, a presença de glicose sérica é o estímulo principal, mas não exclusivo, para a secreção de insulina pelo pâncreas. Pelo transportador de glicose GLUT2 presente na membrana da célula beta, a glicose difunde-se a favor do seu gradiente de concentração para o citoplasma, onde é fosforilada em glicose-6-fosfato pela enzima glicoquinase resultando na formação de trifosfato de adenosina (ATP). O aumento da relação ATP/ADP promove o bloqueio dos canais de potássio da membrana plasmática que diminui o efluxo de potássio, resultando no acúmulo de carga positiva no interior celular, promovendo a despolarização da membrana. Com isso, ocorre a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, por onde ocorre o influxo deste íon que estimula a fusão entre a membrana plasmática com as vesículas contendo insulina. O estímulo da secreção de insulina pela inibição dos canais de potássio

sensíveis ao ATP é o mecanismo de ação dos antidiabéticos orais do tipo sulfoniluréia, utilizadas no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2. O local de ação desse fármaco é na subunidade regulatória do canal de potássio designado de SUR (do inglês, *Sulfonylurea receptor*), tendo mais afinidade pela isoforma SUR1; ligando-se a ela, ocorre a inibição da outra subunidade do canal, o KIR6.2 que provoca o fechamento do canal de potássio. Da afinidade do fármaco com a isoforma SUR1 resulta em mais especificidade de ação molecular sobre as células beta. Agentes anti-hipertensivos que agem nos canais de potássio presentes no músculo liso vascular não influenciam na secreção da insulina, pois agem com mais afinidade sobre a subunidade SUR2A do que pela SUR1. As meglitinidas são outra classe de antidiabético oral que, ligando-se ao receptor SUR1 estimulam a liberação de insulina. Contudo essa ligação ocorre em regiões diferentes do receptor. (DEAN, 2004; GUYTON, 2011; ORIÁ; BRITO, 2016).

2.3.1.2 Receptor de insulina

O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica, com duas subunidades alfa extracelulares e duas beta transmembrânicas. As subunidades alfa contêm cada uma um sítio de ligação com a insulina e exercem sobre as subunidades beta efeito inibitório, removido após a ligação desse hormônio a uma ou duas subunidades alfa. Já as subunidades beta possuem o domínio com atividade tirosina quinase. Após a remoção do efeito inibitório, ocorre uma mudança conformacional no domínio intracelular que resulta na autofosforilação da tirosina quinase e dos resíduos de tirosina adjacentes contidos na alça de ativação. A ocorrência de mutações em um dos resíduos ou em todos eles causa, respectivamente, a diminuição da magnitude do sinal insulínico ou a inativação completa do receptor (PATTI, 1998; LUCHS, 2006; GUYTON, 2011).

2.3.1.3 Sinalização insulínica

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila em múltiplos resíduos de tirosina proteínas que servem como substrato. Dentre essas proteínas estão um grupo proteico chamado de substrato do receptor de insulina (IRS), que possui quatro isoformas IRS-1, IRS-2, IRS-3 E IRS-4, Além da família de proteínas chamada IRS, há também outros substratos proteicos que são Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS. A maioria desses substratos após fosforilados expõe sítios de ligação que servem como ponto de reconhecimento e ativação de pelo menos três vias como a via do fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), a CAP/Cbl e a via da RAS. A ativação dessas vias resulta na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática,

em glicólise, na síntese de glicogênio, no metabolismo de lipídeos, na síntese proteica, na diferenciação, na proliferação celular e na inibição da apoptose (SAAD et al. 1996; PESSIN; SALTIEL, 2000). Sendo assim, não a insulina, mas o seu receptor por ela ativado é que promove uma cascata de eventos de fosforilação e desfosforilação de proteínas. O sinal insulínico pode ser inibido pela ação de proteínas fosfatases de tirosinas, as PTPases dentre as quais se destaca a isoforma PTP1B. Essas proteínas desfosforilam o receptor de insulina e seus substratos, inativando-os. Outro evento inibitório ocorre quando as proteínas IRSs são fosforiladas em resíduos de serina ao invés de tirosina, reduzindo a capacidade do receptor de insulina de se fosforilar em tirosina, após ligar-se com esse hormônio, resultando em um *feedback* negativo caracterizado pela atenuação do sinal insulínico, que pode levar a um quadro de resistência insulínica (GUYTON, 2011, ORIÁ; BRITO, 2016).

2.3.1.4 Resistência insulínica

A cascata de eventos desencadeada pela ação da insulina estimula a captação de glicose sérica e a produção de glicogênio, do mesmo modo que inibe a quebra de lipídeos e de glicose endógena. A diminuição desses efeitos metabólicos caracteriza uma condição de resistência à insulina. Como medida compensatória para manter a normoglicemia ocorre o aumento da síntese e secreção desse hormônio, gerando um quadro de hiperinsulinemia. A incapacidade das células beta na compensação da hiperglicemia pode resultar na perda por apoptose dessas células, que leva a diminuição gradativa da produção de insulina, mantendo o organismo no estado de hiperglicemia. Por isso, a resistência insulínica está associada ao diabetes tipo 2, por ser a causa primária de acúmulo de glicose sérica no organismo. Indivíduos insulino resistentes evoluem não apenas para diabetes tipo 2, mas desenvolvem também hipertensão, aterosclerose prematura e dislipidemia, isolada ou conjuntamente, a depender de fatores ambientais e genéticos. O quadro de resistência insulínica anterior a essas doenças tem sido chamado de obesidade metabólica, síndrome metabólica ou síndrome X. O aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos-alvo pode ser auxiliado pelo uso de tiazolidinedionas e biguanidas, que são os chamados sensibilizadores da insulina (DEAN, 2004; GOLAN, 2009; GUYTON, 2011).

2.4 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO HEPÁTICO

2.4.1 Fígado

O fígado é um órgão chave na regulação do metabolismo da glicose, devido a sua capacidade em captar e armazenar a glicose no estado alimentado, e liberá-la gradativamente

nos períodos de jejum e nas atividades físicas, por exemplo. O sangue do aparelho digestivo é quase todo drenado para o fígado, possibilitando, por este órgão, a remoção de quaisquer substâncias nocivas ao organismo que possam ter sido ingeridas, antes que atinjam a circulação sistêmica. Desta forma, ocorre o influxo de grande quantidade de glicose sérica nas células hepáticas pelo GLUT2, seguindo-se à fosforilação que a converte em glicose-6-fosfato (G6P), ficando assim impedida de sair até que haja a reversão dessa condição. A entrada de glicose sérica no fígado ocorre sem sinalização mediada por insulina, por ser a sua entrada através do GLUT2. Ainda assim, pelo sistema porta hepático o fígado recebe a insulina endógena, recém secretada pelo pâncreas, servindo para estimular a ação da enzima glicogênio sintase, resultando no armazenamento imediato da maior parte da glicose absorvida no intestino delgado após uma refeição (DEAN, 2004; KAHN, 2009; GUYTON, 2011; DE MARIA et al, 2011).

2.4.1.1 Glicólise

Já no citoplasma, o uso imediato de parte da glicose ocorre pela via glicolítica, que é uma via comum a quase todos os tipos celulares, tanto procariontes quanto eucariontes. Em seguida ao consumo de alimentos, os níveis de insulina aumentam concomitante a diminuição do glucagon, estimulando a glicólise que resulta na liberação de energia e na produção de outros intermediários de carboidratos, utilizáveis em outras vias metabólicas (DEAN, 2004). Ela pode ser didaticamente compreendida em três estágios, sendo que do primeiro estágio resulta a captura e desestabilização da glicose, que origina um composto que pode ser facilmente clivado em unidades fosforiladas com três carbonos; nesta etapa ocorre uma fosforilação que é catalisada pela enzima hexoquinase, (Gck, no fígado), seguida de uma isomerização, passando para outra fosforilação. No segundo estágio, a molécula frutose-1,6-bifosfato contendo seis carbonos é clivada em dois fragmentos com três carbonos cada. Finalmente, os fragmentos de três carbonos sofrem oxidação para piruvato, resultando em ATP, sendo este o terceiro estágio da glicólise (BERG, 2004).

2.4.1.2 Glicogênese e Glicogenólise

A glicose que excedeu a utilização na via glicolítica é convertida em glicogênio na maioria dos tecidos, mas principalmente no muscular esquelético e hepático, através de um processo chamado de glicogênese. O glicogênio é uma forma de armazenamento que pode ser facilmente revertida em glicose quando o organismo necessita de energia. É um longo polímero ramificado de resíduos de glicose, que se precipita em forma de grânulos, tem alto

peso molecular e possibilita o armazenamento de grandes quantidades de carboidratos sem que haja a alteração da relação osmótica entre os líquidos extra e intracelular. Quando a quantidade de glicose armazenada no fígado sob a forma de glicogênio ultrapassa a capacidade de armazenamento desse órgão, então o excesso de glicose é convertido em ácidos graxos (lipogênese), que são empacotados sob a forma de triglicerídeos, transportados para o tecido adiposo onde ficam depositados como gordura. Além disso, ao contrário dos ácidos graxos, essa forma de energia é prontamente mobilizável à glicose, o que é necessário em condições de exercício extenuante (DEAN, 2004; GUYTON, 2011).

As reações químicas que ocorrem na glicogênese são catalisadas por diversas enzimas no sentido de converter a glicose-6-fosfato (ponto de partida da glicogênese) em glicogênio; a cadeia de glicogênio é alongada pela enzima glicogênio sintase (GlyS2) que se torna ativa ao ser desfosforilada na ausência de glicose, seu ativador alostérico; essa enzima pode ser considerada como um indicador de glicose-6-fosfato (NELSON; COX, 2014).

Ao processo de quebra do glicogênio que ocorre principalmente no fígado dá-se o nome de glicogenólise que objetiva liberar glicose para o sangue quando o nível de glicose sérica diminui. Esse processo de quebra do glicogênio é constituído de três etapas: 1) liberação de glicose-1-fosfato a partir do glicogênio, 2) remodelação do substrato do glicogênio e 3) conversão da glicose-1-fosfato para glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato pode ser utilizada como substrato inicial da glicólise ou pode ser processada na via pentose fosfato ou ainda, ser convertida em glicose livre, apta para ser liberada na corrente sanguínea. A enzima glicose-6-fosfatase (G6Pase) presente no fígado e no rim é necessária a esse processo. É uma proteína transmembrânica do retículo endoplasmático (RE) que possui sua unidade catalítica voltada para o lúmen do RE e é responsável por hidrolisar a glicose-6-fosfato, que passa do citosol para o RE por meio do transportador específico T1. Os produtos resultantes, fósforo inorgânico e glicose, provavelmente retornam pelos transportadores T2 e T3 para o citosol, de onde a glicose deixa o hepatócito pelo Glut2 presente na membrana celular. O processo de glicólise que ocorre no citosol não é interrompido pela G6Pase devido a localização do sítio catalítico dessa enzima. Dessa forma, garante-se a não interferência entre esses dois processos (NELSON; COX, 2014).

Liberado entre as refeições ou no jejum, o glicogênio sintetizado no músculo esquelético depois de degradado é utilizado para suprir as necessidades próprias desse tecido, pois na ausência da G6Pase que desfosforila a glicose-6-fosfato, não é possível fornecer glicose ao sangue; enquanto que aquele que é sintetizado e degradado no fígado é útil para

manter os níveis de glicose no sangue, atendendo a necessidade de outros tecidos exaurindo-se, contudo no período entre 12 a 24 horas (DEAN, 2004; GUYTON, 2011; NELSON; COX, 2014).

2.4.1.3 Gliconeogênese

No período entre as refeições, no jejum prolongado ou após exercícios vigorosos, o estoque de glicogênio se esgota. Nesses períodos o organismo se adapta sintetizando glicose a partir de precursores não carboidratos; esse processo é chamado de gliconeogênese. Dessa forma, o fornecimento de glicose a órgãos que a utilizam como principal ou única fonte de energia não é interrompido. Os precursores utilizados nesse processo que ocorre principalmente no fígado e, em menor extensão no rim e intestino delgado, são lactato, glicerol e alguns aminoácidos; esses precursores ou são primeiro convertidos a piruvato como ocorre com o lactato ou entram posteriormente na via, como alguns aminoácidos no intermediário oxaloacetato, e o glicerol no intermediário dihidroxiacetona fosfato (BERG et al, 2004; NELSON; COX, 2014).

As vias glicolítica e gliconeogênica não são idênticas e nem opostas, apesar do compartilhamento de várias etapas, pois na glicólise a glicose é convertida em piruvato, na gliconeogênese o piruvato é convertido em glicose. A gliconeogênese compreende dez etapas das quais sete são reversíveis inversas à glicólise enquanto que as outras três são etapas não comuns, irreversíveis, catalisadas por enzimas não utilizadas na glicólise, são as chamadas *reações de contorno* (Quadro 1) exclusivas da gliconeogênese, que ocorrem por meio de quatro reações alternativas (HARVEY et al, 2012; NELSON; COX, 2014).

Quadro 1 – Dez reações enzimáticas da gliconeogênese, das quais sete são comuns a glicólise e as demais são exclusivas da gliconeogênese (marcadas em azul).

Etapas da via gliconeogênese	
1	Piruvato + HCO ₃ ⁻ + ATP → oxaloacetato + ADP + Pi
2	Oxaloacetato + GTP ⇌ fosfoenolpiruvato + CO ₂ + GDP
3	Fosfoenolpiruvato + H ₂ O ⇌ 2-fosfoglicerato
4	2-Fosfoglicerato ⇌ 3-fosfoglicerato
5	3-Fosfoglicerato + ATP ⇌ 1,3-bifosfoglicerato + ADP
6	1,3-Bifosfoglicerato + NADH + H ⁺ ⇌ gliceraldeído-3-fosfato + NAD ⁺ + Pi
7	Gliceraldeído-3-fosfato + dihidroxiacetona-fosfato ⇌ frutose-1,6-bifosfato
8	Frutose-1,6-bifosfato → frutose-6-fosfato + Pi
9	Frutose-6-fosfato ⇌ glicose-6-fosfato
10	Glicose-6-fosfato + H ₂ O → glicose + Pi

Fonte: Adaptado de Nelson; Cox, 2014

A primeira reação contorna a irreversibilidade da conversão de fosfoenolpiruvato em piruvato, na glicólise. Na gliconeogênese o piruvato é carboxilado produzindo oxaloacetato, que é convertido a fosfoenolpiruvato pela enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Essa enzima se apresenta em duas isoformas (codificadas por genes separados nos cromossomos nucleares), a PEPCK1 encontrada no citosol e a PEPCK2, na mitocôndria. Com isso, o oxaloacetato pode ser convertido a fosfoenolpiruvato tanto na mitocôndria, local de sua produção, quanto no citosol, para onde ele deverá ser transportado e então convertido; o fosfoenolpiruvato então segue para as reações glicolíticas inversamente, até frutose-1,6-bifosfato (HARVEY et al, 2012; NELSON; COX, 2014).

A segunda reação de contorno é catalisada pela enzima frutose-1,6-bifosfatase que por hidrólise irreversível da frutose-1,6-bifosfato converte-a em frutose-6-fosfato (HARVEY et al, 2012).

Na terceira e última reação de contorno ocorre a formação de glicose livre a partir da desfosforilação da glicose-6-fosfato pela enzima G6Pase no RE. Contudo essa etapa de desfosforilação da glicose-6-fosfato só ocorre em tecidos como o hepático e o renal, visto serem fornecedores de glicose para suprir outros órgãos. Nos tecidos como o muscular esquelético que supre apenas as suas próprias necessidades, não ocorre essa desfosforilação

pela ausência da enzima G6Pase; para esses tecidos a gliconeogênese vai até o intermediário glicose-6-fosfato (NELSON; COX, 2014).

2.5 ASPECTOS GERAIS DO METABOLISMO RENAL DA GLICOSE

Assim como o fígado, é através de regulação neuro-hormonal que o rim participa da manutenção da homeostase da glicose, que é influenciada por fatores físicos e bioquímicos, pois a depender do fluxo sanguíneo e da localização específica de determinados transportadores e enzimas é que ocorre o metabolismo da glicose em diferentes regiões do rim (CERSOSIMO, 2004).

No rim, um sistema de cotransporte ativo de sódio e glicose em condições normais reabsorve para o interior da célula a glicose filtrada pelo glomérulo, devolvendo-a para a circulação sistêmica e impedindo que ela seja excretada pela urina. Isso é uma resposta adaptativa renal para a conservação de energia. Esse cotransportador de sódio e glicose chamado de SGLT é codificado por genes pertencentes à família SLC5 que é composta por doze genes, sendo que as isoformas SLC5A1 e o SLC5A2 codificam os cotransportadores SGLT1 e SGLT2, respectivamente (5,51/5,53) ambos expressos no lúmen do túbulo proximal renal, contudo o SGLT2, que está localizado no seguimento S1, é um transportador de glicose com baixa afinidade, mas alta capacidade de carregamento, sendo responsável pela reabsorção de 90% da glicose filtrada pelo rim. Já o SGLT1 encontra-se nos seguimentos S2 e S3, possui alta afinidade, baixa capacidade de transporte e realiza o cotransporte da glicose remanescente do seguimento S1. (HEDIGER et al, 1989; NEUMILLER, 2010). No diabetes tipo2, quando a hiperglicemia ultrapassa o limiar de reabsorção do túbulo renal (superior a 180 mg/dl), ocorre a excreção da glicose, condição denominada de glicosúria (GUYTON, 2011; OWEN, 1969).

O rim também participa do processo de gliconeogênese utilizando como principal substrato, aminoácidos provenientes do músculo. No jejum inicial, a glicose liberada pela gliconeogênese renal é de aproximadamente 5 a 10% do total de glicose circulante, menor do que a liberação hepática, contudo após um jejum prolongado esse valor chega a 50% (DEAN, 2004).

2.6 TRATAMENTO DO DIABETES

2.6.1 Terapias de referência no tratamento da diabetes

Segundo Skyler (2017) a qualidade de vida do indivíduo com diabetes, bem como a prevenção das complicações crônicas causadas por essa doença depende de um controle da glicemia que inclui adoção de hábitos saudáveis, manutenção de peso ideal e uso de agentes

hipoglicemiantes. O uso destes depende das características individuais como, por exemplo, idade, da fisiopatologia, dos efeitos colaterais, da interação entre medicamentos, do mecanismo de ação, do custo, dentre outros. Esses agentes estão didaticamente divididos em classes que os caracterizam conforme sua ação no organismo. As classes mais comuns são:

Sensibilizadores: auxiliam no tratamento por diminuir a resistência tecidual à insulina e melhorar ação dela no metabolismo da glicose. Nesta classe estão as biguanidas das quais a única atualmente disponível é a metformina que age principalmente no fígado, inibindo a gliconeogênese e a glicogenólise, e estimula a glicogênese, e nos tecidos periféricos dependentes de insulina, sua ação ocorre pela captação da glicose periférica; exerce ação no metabolismo lipídico e no endotélio. Desconfortos como náusea, diarreia e dor abdominal são efeitos adversos comuns; não provoca hipoglicemia por não aumentar os níveis de insulina plasmática. É contraindicada para indivíduos com comprometimento da filtração glomerular; exceto em situações de contraindicações, a recomendação atual é a de uso inicial em todos os pacientes (BAILEY, 1996; SILVEIRO; SATLER, 2015).

Secretagogos: é a classe mais utilizada, representada pelas sulfoniluréias e glinidas; a recomendação das sociedades médicas é que o uso desses agentes deve ser posterior à outra classe: dos sensibilizadores, como a metformina. Como bem descrito pelo nome, os secretagogos agem nas células beta estimulando a secreção de insulina, tanto no estado pós prandial quanto no jejum. Por esse último motivo, complicações como hipoglicemia estão associadas aos secretagogos. Há ainda a possibilidade de ganho de peso resultado dos efeitos anabólicos da insulina e da tentativa de prevenção da hipoglicemia (SILVEIRO; SATLER, 2015).

Inibidores da enzima alfa-glicosidase: esta enzima está presente no intestino delgado e é responsável pela quebra de oligossacarídeos em monossacarídeos. Quando essa enzima é inibida, ocorre um retardo na velocidade de absorção dos monossacarídeos, diminuindo a elevação da glicose pós prandial. Comparado aos outros agentes orais, os inibidores da alfa-glicosidase têm uma intensidade diminuída sobre o controle glicêmico (LAUBE, 2002).

Inibidores do cotransportador de sódio-glicose (SGLT2): a glicose filtrada no rim é reduzida pela inibição do cotransportador SGLT2 localizado no túbulo proximal renal, resultando na excreção da glicose que seria reabsorvida. Esse controle independe da secreção e da ação da insulina, com risco diminuído de hipoglicemia e o favorecimento da perda de peso. Podem ser utilizados como monoterapia ou terapia complementar e adicionalmente

apresentam o benefício de diminuição da hemoglobina glicada (ABDUL-GHANI; DEFROZO, 2008; STORGAARD, 2016; WHALEN, 2015).

Agonistas do receptor de GLP-1 e Análogos do hormônio GLP-1: o hormônio incretínico GLP-1 (do inglês, Glucagon-like peptide-1) apresenta efeito estimulante sobre a secreção de insulina e inibitório sobre a do glucagon. É responsável pelo efeito incretínico que se refere ao estímulo de aproximadamente 50% da secreção total de insulina pancreática no período pós prandial, efeito esse diminuído em indivíduos com diabetes. Como possui meia vida plasmática curta, esse hipoglicemiante é administrado por via endovenosa, sendo por isso classificado como medicamentos injetáveis não insulínicos (OIRÁ; BRITO, 2016).

Inibidores da enzima DPP-4: a enzima DPP-4 (dipeptidil peptidase) tem por função inibir a ação dos hormônios incretínicos. Diante disso, os hipoglicemiantes inibidores dessa enzima permitem a não interrupção do efeito incretínico, resultando em continuidade da secreção de insulina. Por esse fato, são úteis ao tratamento de pacientes com intolerância à glicose ou diabetes. Eventos hipoglicêmicos não estão associados ao uso dos inibidores da DPP-4 porque seu efeito é dependente de glicose, por outro lado recentemente há o registro de fortes dores nas articulações dos que utilizam esse antidiabético (OIRÁ; BRITO, 2016; TARAPUES et al, 2013).

2.6.2 Plantas medicinais com efeito hipoglicemiante

O uso de produtos naturais, como as plantas medicinais, é base para o tratamento de diversas doenças. A respeito desse tipo de plantas, a OMS estabeleceu o seguinte conceito: “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (OMS, 1998). Para muitas pessoas, as plantas medicinais são a principal alternativa, quando não a única fonte de tratamento, por questões econômicas e/ou geográficas que facilitam o acesso a elas em detrimento aos medicamentos de referência. Essa atração ocorre também pela aceitação cultural, passada entre as gerações, aumentando a confiança em seu uso (BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011; WHO, 2013; VEIGA JUNIOR et al, 2005). Entretanto, esse conceito de inocuidade dos produtos naturais não é verdadeiro. Dados consistentes e definitivos quanto à identificação da planta, parte dela a ser utilizada, doses terapêutica e letal, mecanismo de ação, efeitos adversos, dentre outros, são indispensáveis ao uso seguro e eficaz (HUO et al, 2003; SAID et al, 2002).

Para isso, muitas instituições de pesquisa em todo o mundo investem no desenvolvimento de profissionais com o conhecimento sobre medicina tradicional, a exemplo

de países como África do Sul, Tanzânia e República Democrática do Congo que incluem a matéria Medicina Tradicional no currículo dos cursos de farmácia e medicina. Ademais, muitos dos Estados-membros ligados a OMS possuem institutos nacionais de pesquisa em medicina tradicional e complementar (OMS, 2013). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014 que rege a criação da Classe de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Também lançou em 2017 a primeira edição do Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira; uma obra que reúne 28 monografias alicerçadas em evidências científicas contendo informações a respeito do uso e eficácia de 71 plantas medicinais, objetivando orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos. Diante disso, é evidente o crescimento de pesquisas envolvendo o estudo químico e farmacológico de plantas medicinais, a fim de desmistificar a ideia de que “por ser natural, não apresenta riscos”, determinar com precisão suas propriedades terapêuticas e possibilitar o tratamento de diversas doenças com o uso de medicamentos derivados de plantas medicinais. Um exemplo clássico é o da metformina, uma biguanida largamente utilizada para o tratamento de DM2, ovário policístico e obesidade, e que foi produzida a partir de estudos da planta *Galega officinalis* empregada desde a Idade Média no tratamento de poliúria, um dos sintomas indicativo de diabetes. Outra classe de antidiabético oral, os inibidores do cotransportador de sódio e glicose SGLT2, também foi derivada de plantas medicinais; isso ocorreu no início do século XIX, quando da raiz da macieira foi identificada a florizina, estimulante de poliúria e glicosúria, que resulta na diminuição da glicemia (BRASIL, 2017; BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011; SDB, 2017; WITTERS, 2001).

No Brasil, algumas plantas medicinais são popularmente conhecidas por seu potencial antidiabético. Destas, algumas estão citadas, mas não recomendadas, na Diretriz da SBD, publicada em 2017 e são elas:

- A *Bauhinia variegata*, popularmente conhecida como pata-de-vaca referindo-se ao formato da sua folha com similaridade a uma pata de vaca. Em 2006, Azevedo et al estudando a folha da pata-de-vaca identificaram uma proteína com massa molecular semelhante à insulina bovina, e por meio de testes adicionais descobriram que a referida proteína apresentou atividade similar a insulina suína comercialmente vendida.
- A planta medicinal *Cissus sicyoides* conhecida como insulina, ou anil-trepador, uva-brava ou cipó-pucá é utilizada no tratamento da diabetes, por isso recebeu o nome de insulina vegetal. Apesar disso, não há nenhuma relação entre essa

planta e a insulina produzida pelo pâncreas. Estudos já feitos com a insulina vegetal são em sua maioria brasileiros, sendo o primeiro deles realizado por Beltrame et al (2001) da Universidade Estadual de Maringá; nesse estudo não houve a promoção de efeitos hipoglicemiantes. Já outras pesquisas realizadas por Pepato et al (2003) e Viana et al (2004), apontam o contrário, ou seja, a insulina vegetal apresentou atividade hipoglicemiante. Um estudo clínico realizado por Santos et al (2008) da Universidade Federal da Paraíba avaliou indivíduos pré-diabéticos e outros com diabetes que foram tratados com o chá da insulina vegetal por uma semana. Apesar da diminuição do nível de glicose dos indivíduos pré-diabéticos, o mesmo não foi verificado nos diabéticos; por isso, os autores concluíram que os reais efeitos no tratamento da diabetes por insulina vegetal necessitam de confirmação por meio de outros estudos.

- O fitoterápico chá verde utilizado no tratamento da obesidade tem servido de base para o tratamento da diabetes. Contudo, duas metanálises foram realizadas, sendo uma delas em 2014 por Wang et al avaliando os efeitos do chá verde em parâmetros glicêmicos (Teste oral de tolerância a glicose e hemoglobina glicada) de pacientes com risco aumentando para desenvolver diabetes, e a outra feita em 2016 pela equipe de Li, avaliando o mesmo efeito, mas em pacientes diabéticos. As duas metanálises apresentaram o mesmo resultado, qual seja: nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada.

Além dessas plantas medicinais, algumas espécies do gênero *Baccharis* apresentam potencial antidiabético, como por exemplo, a *B. trimera*, que é popularmente conhecida no Brasil como carqueja (OLIVEIURA et al., 2005). Há ainda a *B. articulata* que em estudos com roedores apresentou ação anti-hiperglicêmica; esta espécie é constituída por um alto teor de flavonoides que lhe conferem potencial antioxidante (KAPPEL, et al., 2012).

Atualmente muitas plantas já têm definidos seus componentes orgânicos (metabólitos), bem como os seus respectivos mecanismos de ação. Alguns desses metabólitos como taninos, terpenos, alcaloides e flavonoides apresentam efeito antidiabético, todavia, faltam estudos clínicos que avaliem esses efeitos em humanos, pois a maioria das pesquisas realizadas *in vivo* por meio de modelos animais relata o efeito antidiabético de diversas plantas medicinais sem, contudo apresentar as informações necessárias que possibilitem o teste clínico, a validação e o uso terapêutico (MAZID et al, 2011; SDB, 2017).

Dentre essas substâncias que apresentam ação antidiabética, os flavonoides presentes nas plantas como metabólitos secundários desempenham atividades de proteção contra agentes oxidantes, pigmentação de frutos e flores e regulação do crescimento vegetal. Apesar de não serem sintetizados na espécie humana, interagem sobre o sistema biológico dessa espécie (LOPES et al, 2010). São relativamente estáveis e isso lhes proporciona resistência contra oxidação, altas temperaturas e variações de acidez (KUMAR; PANDEY, 2013). Segundo Machado et al (2008), a sua estrutura química básica, o flavilium, que é o precursor inicial de todas as classes de flavonoides, é constituída por 15 carbonos que estão arranjos em dois anéis aromáticos (os benzenos), interligados a uma estrutura heterocíclica central (o pirano). Essa estrutura admite modificações químicas através de hidroxilação, metilação, glicosilação, hidrogenação, malonilações e sulfatações, que originam novos arranjos estruturais com diferentes atividades biológicas, que resultam em uma grande variedade de classes de flavonoides, como por exemplo, as que estão listadas no quadro 2.

Quadro 2 – Principais classes de flavonoides com os seus principais representantes e fontes

Classes	Principais representantes	Fonte
Antocianinas	Cianidina, delphinidina, peomidina	Frutas, flores
Flavanas	Catequinas, epicatequinas, luteoforol, proceanidinas, theaflavinas	Frutas, chás, lúpulo, nozes, água de coco
Flavonas	Hesperidina, naringerina	Frutas cítricas
Flavonóis	Quercetinas, rutinas, micertinas, camferóis	Frutas, folhas
Isoflavonoides	Daidzeína, genisteína	Legumes (soja)

Fonte: Adaptado de Lazary 2010

Tanto dos arranjos estruturais dos flavonoides como da combinação entre a estrutura química deles com a de outras substâncias, como por exemplo, os terpenos, são determinados o papel desempenhado nas plantas pelos flavonoides e o seu potencial medicinal, quando presente. Muitas ações terapêuticas dos flavonoides já foram descritas partindo de experimentos laboratoriais, principalmente com roedores (Quadro 3). Em humanos, os relatos

literários são tidos por muitos especialistas como inconclusivos, devido, dentre outros, da não confirmação epidemiológica da correlação entre o consumo de flavonoides com os benefícios à saúde (RODRIGUES et al, 2015).

Quadro 3 – Ações terapêuticas de alguns flavonoides

Flavonoide	Ação terapêutica	Fonte
Quercetina e Caempferol (associados)	Potencial anti-inflamatório pelo envolvimento na proliferação de linfócitos T, pela produção de citocinas pró-inflamatórias como as TNF-a e IL-1	Todorova e Trendafolova (2014)
Quercetinas	Ação vasodilatadora	Pirie et al (2014); Sheuder et al (2014)
Isoflavonoides	Potencialização da ação de enzimas que revisam o DNA (polimerase); inibição da promoção de tumores	Yang et al (2013); Yan et al (2014)
Isoflavonoide (Daidzeína)	Proteção e regeneração de antioxidantes primários (ácido ascórbico, tocoferol e -caroteno); inibição das reações oxidativas deletérias aos tecidos; inibição de enzimas envolvidas na carcinogênese	Brewer et al (2014); Ma (2014); Pan et al (2013); Pericleous et al (2014)
Isoflavonas (aquelas consideradas fitoestrógenos)	Efeitos benéficos nos distúrbios de pós menopausa	Pericleous et al (2014)
Isoflavonas	Redução da lipogênese e aumento da lipólise	Torrezan et al (2008)
Antocianidinas	Aumento da secreção de insulina; diminuição da apoptose e promoção da proliferação das células beta pancreáticas; regulação do metabolismo	Babu et al (2013)

	hepático da glicose; redução da resistência tecidual a insulina	
--	---	--

2.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL UTILIZADA NA INVESTIGAÇÃO MOLECULAR DOS EFEITOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, comumente conhecida como PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), ocorre, *in vitro*, a detecção e a amplificação de uma sequência alvo presente nos ácidos nucleicos chamada de amplicon (TYRREL, 1997). Essa técnica é realizada por meio de um equipamento chamado de Termociclador que, pela sua variação interna de temperatura, viabiliza a desnaturação da fita dupla de DNA, seguida da seleção de fragmentos específicos e posterior amplificação desses fragmentos, pela sua restauração à fita dupla. O amplicon é determinado pela presença de sequências iniciadoras do processo de síntese, os *primers*, sendo um o *primer forward* e o outro, o *reverse*. Os *primers* são oligonucleotídeos de DNA de fita simples, que se acoplam complementarmente a uma região específica do DNA molde quando já desnaturado, delimitando-a e amplificando-a, pela ação da enzima polimerase termoestável Taq (abreviação derivada de *Thermus aquaticus*, uma bactéria isolada de fontes termais) que acrescenta à região, nucleotídeos complementares à fita simples em uma extensão compreendida entre os *primers forward* e *reverse*. Dessa forma, a região amplificada torna-se progressivamente mais abundante que o DNA inicial, possibilitando sua posterior utilização através de sequenciamento, genotipagem ou clonagem (SANTOS et al, 2014). Há que se considerar que, tanto a ligação do par de *primers* na fita molde simples quanto a amplificação da região delimitada por esse par de *primers* são regidas pelo princípio da complementariedade nucleotídica, sendo as bases adenina-timina ligadas entre si por duas pontes de hidrogênio e citosina-guanina, ligadas por três pontes de hidrogênio, o que torna essa ligação mais forte que aquela (GIBAS et al, 2001). Após a obtenção do amplicon, sua visualização ocorre por meio de outra técnica, a eletroforese, por onde se avalia a quantidade e o tamanho do produto alvo, através da sua comparação com o tamanho de uma sequência-padrão de concentração pré-determinada. Por isso se diz que a PCR é uma técnica que resulta em análise do tipo qualitativa e semi-quantitativa, já que a quantidade de pares de bases observada após a amplificação pode ser comparada visualmente com um marcador com quantidade conhecida e a partir disso, se inferir a quantidade aproximada de DNA presente após a amplificação por comparação da luminescência das duas amostras. Contudo, por ser a eletroforese uma análise que ocorre somente após o término da

reação de PCR, torna-se imprecisa a determinação da quantidade inicial de ácido nucleico (YUNG-SHARP; KUMAR, 1989).

A quantidade de transcrito de um determinado alvo pode ser quantificada indiretamente a partir de amostras de RNA, sendo necessária nesse caso, a transcrição reversa, que resulta no DNA complementar (cDNA) pela ação da enzima transcriptase reversa; o PCR com a utilização deste tipo DNA molde é denominado RT-PCR (do inglês *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, ou amplificação em cadeia da polimerase da transcrição reversa) e a análise desse produto ocorre por PCR em tempo real (VALASEK; REPA, 2005).

2.7.1 PCR quantitativa em tempo real

Do desdobramento evolutivo da PCR foi criada a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que permite o monitoramento em tempo real da amplificação dos ácidos nucleicos, sendo isso conseguido pela presença de compostos químicos, que emitem fluorescência de maneira diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado. Destarte, ao final da reação, diferente da PCR convencional, não se faz necessário o pós-processamento do material amplificado para avaliar o resultado, aumentando a rapidez de sua obtenção. Outra diferença está no tipo do Termociclador, que na qPCR em tempo real possui um sistema ótico que capta a fluorescência emitida no processo de amplificação; o aparelho é conectado a um computador contendo um software específico para a leitura e análise das informações emitidas durante a reação (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Por meio dessa técnica pode-se determinar indiretamente a quantidade de RNA, que resulta em saber o quanto um gene está sendo expresso (ou inibido), possibilitando a investigação molecular dos mecanismos fisiopatológicos, o desenvolvimento de respostas terapêuticas, dentre outros (VALASEK; REPA, 2005).

Os compostos químicos fluorescentes que possibilitam a detecção do produto amplificado estão divididos em duas categorias, conforme sua forma de ação, sendo estes 1) corantes intercalares, que se ligam a fita dupla de DNA recém amplificada e 2) sondas de sequência específica, que é homóloga a região da sequência a ser amplificada definida por *primers* (KUBISTA et al, 2006; HIGUCHI et al, 1993). O sinal de fluorescência logaritimizado está relacionado com a quantidade inicial de RNA, sendo a partir disso, estabelecida a linha do *threshold*, que é determinada dentro da faixa onde a detecção de fluorescência cresce de maneira exponencialmente constante, ou seja, acompanhando a amplificação do produto alvo (LOBO; LOBO, 2014).

Segundo VALASEK e REPA (2005) reação de qRT-PCR está dividida nas fases: fase exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária.

- ✓ Fase exponencial: onde ocorre a detecção das amplificações, sendo determinado o limiar de detecção (*Threshold*).
- ✓ Fase de crescimento linear: diminuição da eficiência, com menor disponibilidade de reagentes, devido ao seu consumo durante as amplificações.
- ✓ Fase estacionária: devido ao esgotamento dos reagentes, ocorre a estagnação da reação.

Outros conceitos importantes, inclusive para a interpretação dos resultados, se referem à análise do gráfico, sendo esses (LOBO; LOBO, 2014):

- ✓ *Baseline*: determinada pelos primeiros ciclos, onde não há emissão de fluorescência.
- ✓ *Threshold*: É um valor selecionado arbitrariamente pelo software dentro da fase exponencial de acordo com a *baseline*.
- ✓ *Cycle Threshold (Ct)*: é o ciclo onde ocorre o cruzamento entre a curva de amplificação e a linha do *Threshold*, ou seja, o ciclo quando a fluorescência atinge o valor determinado pelo *Threshold*.

A quantificação gênica pode ocorrer através de dois métodos 1) quantificação absoluta, por curva padrão e 2) quantificação relativa, pela comparação do Ct (HIGUCHI et al, 1993).

Pela quantificação absoluta se obtém o número absoluto de cópias do gene alvo ao se comparar o resultado com uma curva padrão contendo valores predeterminados, podendo ser útil na investigação, por exemplo, da carga viral, onde é necessário o número absoluto de amplicons. Na quantificação relativa, o resultado se dá ao comparar a expressão gênica, de um grupo exposto a um tratamento com outro grupo não exposto (grupo controle). É usada nas situações nas quais é desnecessário determinar o número absoluto de amplicons, por exemplo, ao se dizer que um determinado tratamento estimulou (ou inibiu) 2,5 vezes a expressão de um gene pode ser suficientemente tão relevante quanto dizer que houve aumento (ou diminuição) da expressão gênica de 1000 para 2500 cópias por células (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

A comparação entre a expressão gênica do tratamento e controle deve ser antecedida de normalização que é feita por um gene endógeno, também chamado de normalizador ou *housekeeping* ou gene de referência. O gene endógeno codifica proteínas estruturais da célula (gene constitutivo) sendo o gene da proteína β -actina, que constitui o citoesqueleto, um exemplo desse tipo de gene. Utilizado como controle interno, serve para corrigir as diferenças

na quantidade inicial de RNA decorrentes de diferenças mínimas na quantidade de tecido inicial e/ou eficiência da transcrição reversa entre as amostras. Esta normalização é obtida pela comparação dos resultados da expressão do gene de interesse com a do gene endógeno e isso é viável porque, ante ao tratamento para investigar a expressão do gene de interesse, o endógeno não sofre variação significativa a nível transcricional, ou seja, sua expressão permanece estável (CZECHOWSKI et al, 2005; PAOLACCI et al, 2009). Contudo, antes que seja feita a normalização da sequência alvo, o tanto o gene alvo quanto o controle endógeno devem passar por processo de validação que avalia sua estabilidade de amplificação (GUTIERREZ et al, 2008) pela construção de uma curva de padrão utilizando diferentes concentrações, onde é avaliada a linearidade e a inclinação da reta (APPLIED BIOSYSTEMS, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho está inserido em uma pesquisa intitulada Desenvolvimento Nanobiotecnológico e Estudos Fitoquímicos com Espécies Vegetais, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – Unifap sob o protocolo nº 002A22012.

3.1 COLETA DO MATERIAL PARA ANÁLISE

Os tecidos utilizados para análise foram retirados de ratos, machos, pesando entre 300-350g, aclimatados no Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá, onde se conduziu o experimento. Do início ao fim do tratamento dos animais foram registradas informações quanto ao peso corpóreo, ingestão alimentar e hídrica.

Para a indução ao diabetes experimental, os animais receberam aplicação intraperitoneal de aloxano (65 mg/kg), tendo sido esse procedimento repetido após 3 dias. Após a indução do diabetes experimental foram incluídos no experimento os animais que apresentaram o valor da glicemia $> 250 \text{ mg/dl}^{-1}$. Assim, os animais diabéticos foram aleatoriamente subdivididos em três subgrupos, a saber:

- Rato diabético não tratado a com nanodispersão de fração flavonoídica de *B. reticularia* (n = 6): grupo controle do experimento.
- Rato diabético tratado com nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia* (n = 5): o tratamento com a nanodispersão flavonoídica de *B. reticularia*
- Rato diabético tratado com veículo da nanodispersão de uma fração flavonoídica de *B. reticularia* (n = 6)

Para a análise molecular foram retiradas, por animal, três amostras de fígado e de pâncreas, e uma de cada rim, imediatamente após a eutanásia dos animais. Os tecidos, de até 50 mg, foram imediatamente imersos em 1ml de RNALater da Ambion® e estocados a -20°C até o processamento.

3.2 ENSAIOS COM ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada com base no método de Trizol, da Invitrogen®, seguindo as instruções do fabricante. O material, previamente conservado em RNALater (Ambion™), foi adicionado em 1ml de Trizol e então macerado com pistilos estéreis. Após incubação em temperatura ambiente por 5 minutos foi adicionado 200µl de clorofórmio à

amostra seguida de agitação manual por 15 segundos, sendo novamente incubado por 2,5 minutos em temperatura ambiente, foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, o que resultou na separação das fases, ficando na região superior do tubo a fase aquosa contendo RNA; DNA e proteínas na interfase e na região inferior do tubo, a fase orgânica contendo lipídeos e fenol/clorofórmio.

A fase aquosa foi recuperada para um novo tubo no qual foi adicionado 500µl de Isopropanol a 100%, agitado por vórtex e mantido por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução foi conduzida a nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e ao final foi desprezado o sobrenadante ficando apenas o pellet de RNA.

O pellet de RNA foi lavado com 1ml de Etanol a 75% a -20°C e, após uma breve agitação por meio do vórtex, foi centrifugado a 7.500 x g, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e por 5 minutos o tubo foi mantido aberto em temperatura ambiente para evaporação dos resíduos de etanol. O pellet de RNA foi ressuspensão em 30µl de água para injeção e então armazenado por no máximo 30 dias a -20°C até a sua transcrição reversa para síntese de DNA complementar.

3.2.2 Síntese de DNA complementar – Transcrição Reversa (do inglês *Reverse Transcription, RT*)

A partir do RNA total extraído das amostras foi realizada a sua transcrição reversa (RT) com a enzima Transcriptase Reversa MMulv (Applied Biosystem®), resultando na síntese do DNA complementar (cDNA). Para testar a eficiência na transcrição reversa das amostras foi produzido o controle negativo (RT⁻), para o qual todo procedimento padrão foi realizado sem a adição da enzima Transcriptase Reversa.

Para a RT foram utilizados os reagentes da Invitrogen®. Cada amostra foi preparada com 1µl de Random *Primer* Hexâmero a 0,2 µg/µL, 1µl de dNTPs a 20 µM de cada nucleotídeo (solução contendo os quatro desoxinucleotídeos dATP, dTTP, dGTP e dCTP) e 6µl de água para injeção e 2µl de RNA. Após a incubação por 5 min a 65°C no Termociclador modelo LifeECO da BIOER® Technology, o material foi imediatamente resfriado em 0°C.

Em seguida, houve a adição de 2µl de Buffer 10X, 1µl da enzima Transcriptase Reversa 7µl de água para injeção em apenas um dos microtubos, diferente do RT⁻, que recebeu 2µl de tampão Buffer 10X BioLabs® e 8µl de água para injeção, totalizando o volume final com 20µl, em cada microtubo. A amostra foi novamente para o Termociclador sendo processado com a programação em 25°C a 5 minutos, 42°C a 60 minutos e 65°C a 20 minutos.

Por fim foi conservado a -20°C até o processamento pela Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

3.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (do inglês, *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*, RT-qPCR)

A quantificação relativa do cDNA foi realizada pela técnica RT-qPCR com o equipamento Real Time PCR System 7500 (Applied Biosystems), usando-se como sistema de detecção da fluorescência o *Power SYBR Green 2x*, da *Applied Biosystems*, em 45 ciclos.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços, tendo em cada poço o volume final de 25 μl , resultado de 12,5 μl de *Sybr Green*, *primer* dos genes alvo, sendo 1,0 μl do *forward* e 1,0 μl do *reverse*, ambos a 10nM, 5,5 μl de água para injeção e 5,0 μl de cDNA diluído 10X. Exceto a água para injeção, os reagentes utilizados foram da *Applied Biosystem*[®].

Como alvos, foram selecionadas enzimas-chaves do metabolismo de glicose que pudessem de alguma forma, interferir nos níveis glicêmicos por meio de alterações na expressão gênica. A análise das amostras de fígado se restringiu às enzimas Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase-1 (PEPCK-I), Frutose-1,6-bifosfatase-1 (FBP-I) e Glicose-6-fosfatase (G-6-Pase). No pâncreas foi analisada a expressão do gene da Insulina (Ins), tanto da insulina-1 quanto da insulina-2 e no rim, do gene *Slc5a2* referente ao cotransportador de sódio/glicose SGLT2.

3.3 TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

3.3.1 Desenho de *primers*

Para essas análises, foram desenhados *primers*, *forward* e *reverse*, (Quadro 4) pelo programa CLC *Genomics Workbench*[®] (versão 3.6.5), alinhando as sequências do genoma com as sequências específicas de RNA mensageiro (mRNA) de cada alvo, ambas exportadas do banco de dados do *GenBank*. Após o “pareamento” entre o genoma e a sequência do mRNA específica, foram feitas as marcações dos éxons de cada gene alvo. A partir disso, foram selecionadas regiões para a produção do *primer*. Os critérios utilizados para essa escolha foram, sempre que possível, regiões de junções entre dois éxons, de forma a se evitar a amplificação inespecífica a partir de contaminações por DNA genômico residual nas amostras, e, quando possível, incluindo regiões que possibilitassem corte por meio de enzima de restrição. Outros parâmetros como *primers* que gerassem amplicons com tamanho de 100 a 200 pares de base, temperatura de dissociação próxima ao intervalo de 55°C a 60°C e

porcentagem de pares de bases GC com o mínimo de 40% e o máximo de 60%. O gene da proteína beta-actina foi utilizado como normalizador dos resultados. O *primer* específico para esse gene foi descrito por Silveiras (2016).

Quadro 4 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para cada enzima alvo, com a temperatura de Melting teórica, temperatura de associação usada para cada par e código de acesso GenBank da sequência utilizada para o desenho do iniciador.

Nome do Gene (Sigla)	Sequência (5' - 3')	Temperat. Melting	GenBank
Gene normalizador beta-actina (Bact)	(F) CCACCCGCGAGTACAACCTTCTT	55°C	-
	(R) GAAGCCGGCCTTGACACATGCC	55°C	
Fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK1)	(F) CATTATTGACCCCGCCTG	57,09°C	NM_198780.3
	(R) TGACCTTGCCCTTATGCT	56,83°C	
Frutose-1,6-bifosfatase (FBP1)	(F) AATGAGCCTTCGGAGAAA	54,61°C	NM_012558.3
	(R) CCACCAAATGAATTCTCCA	55,84°C	
Glicose-6-fosfatase (G6Pase)	(F) AGGAAAGAATGAACGTGC	55,62°C	NM_013098.2
	(R) CTGTCCAAAAGAATCCACT	55,21°C	
Insulina (Ins)	(F) GCAAGCAGGTCATTGTTC	56,27°C	NM_019129.3 – Ins1
	(R) GTTTGACAAAAGCCTGGG	56,92°C	NM_019130.2 – Ins2
Cotransportador de sódio/glicose (Slc5a2)	(F) TTGTTGTGAAGCTCATGC	56,39°C	NM_022590.2
	(R) CTGCCACAATGAACACCA	56,36°C	

3.3.2 Curva padrão

O teste de eficiência dos *primers* foi feito por meio de uma curva padrão, a partir de cinco diluições 1:5 de cDNA de fígado e pâncreas de rato, e diluições 1:3 de cDNA de rim de rato. Todas as diluições foram testadas em triplicata, considerando-se curvas aceitáveis aquelas com coeficiente de determinação (R^2) maior ou igual a 0,99 para curva com triplicatas de amostras em 5 diluições diferentes e com valores de eficiência aceitáveis àqueles compreendidos no intervalo entre 90% a 110%, a partir da avaliação da inclinação e da linearidade da curva. A diferença entre os valores de eficiência entre o gene alvo e gene normalizador também não pode ficar acima de 5% para as duas curvas.

A amplificação das diluições foi realizada em reação com 12,5µl de *SYBR Green* (Applied Biosystems); 1µl de *primer forward* e 1µl do *reverse* (10µM cada um); 5,5µl de água de injeção e 5µl de cDNA diluído 1:5 em triplicata. A reação ocorreu no Termociclador com ativação da enzima em 50°C por 5 minutos, seguida de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos. Foram realizados 45 ciclos de amplificação, constituídos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, associação de *primers* em temperatura específica para cada par de *primer* por 15 segundos e extensão a 60°C durante 60 segundos. Para confirmar a especificidade do produto da PCR houve a análise da curva de dissociação (curva de *Melting*).

3.3.3 Quantificação relativa do mRNA

A linha de *Threshold*, estabelecida dentro da faixa onde a fluorescência emitida é detectada pelo equipamento com crescimento exponencial entre as diferentes amostras, foi estabelecido e o ciclo no valor do *Threshold* (C_t) foi determinado para todas as amostras individualmente, permitindo a correção das falhas técnicas entre as amostras através do cálculo da diferença entre os C_t s do gene-alvo e do normalizador (ΔC_t). Com os resultados normalizados (ΔC_t), tanto do grupo controle quanto do tratado foi calculada a diferença entre ΔC_t dos animais tratados e o ΔC_t dos animais não tratados, resultando no Delta Delta Ct ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,\text{tratado}} - \Delta C_{t,\text{controle}}$). Com o $\Delta\Delta C_t$ foi possível quantificar relativamente a expressão do gene alvo entre amostras de diferentes tratamentos, utilizando-o na equação $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão da média. As comparações entre os resultados foram submetidas a teste *t* de Student entre a média dos valores das amostras tratadas e não tratadas, e foi considerado e o nível de significância $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENHO DOS *PRIMERS*

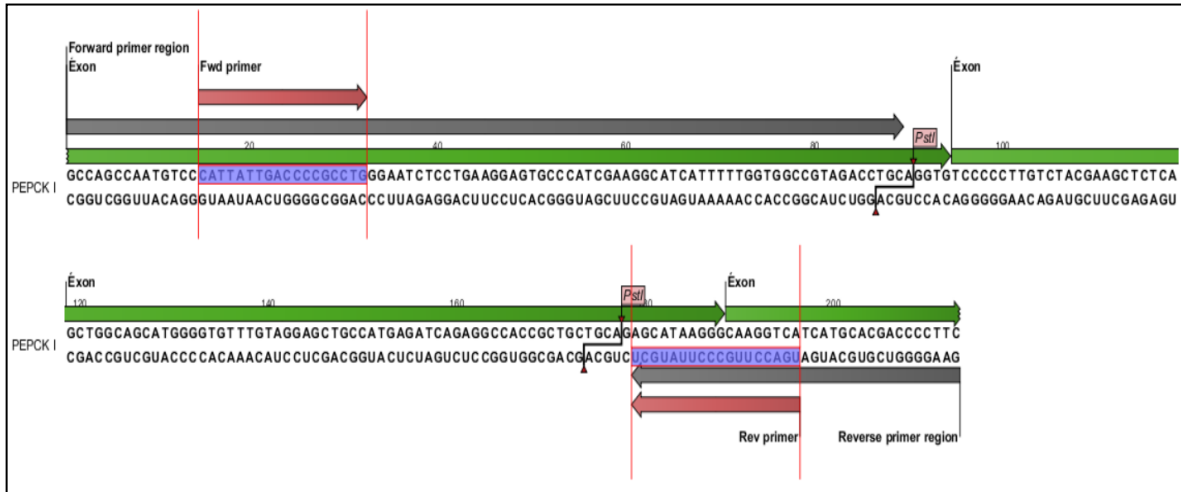
Exceto o normalizador beta-actina, os *primers* para a investigação dos alvos PEPCK1, FBP1, G6Pase, Insulina e SGLT2 foram desenhados especificamente para esta pesquisa. Dessa forma, a escolha das opções de *primers* oferecidas pelo programa CLC Workbench se baseou naqueles que foram desenhados em regiões compreendidas entre dois éxons, para evitar a amplificação de produto proveniente de contaminação por DNA genômico e/ou nos que determinassem amplicons que possibilitassem cortes por enzimas de restrição. Assim, as especificações de cada *primer* estão descritas no quadro 5, seguido das ilustrações do desenho de cada *primer* (Figura 2).

Quadro 5 – Especificidades de cada *primer* escolhidas na etapa de desenho dos *primers*

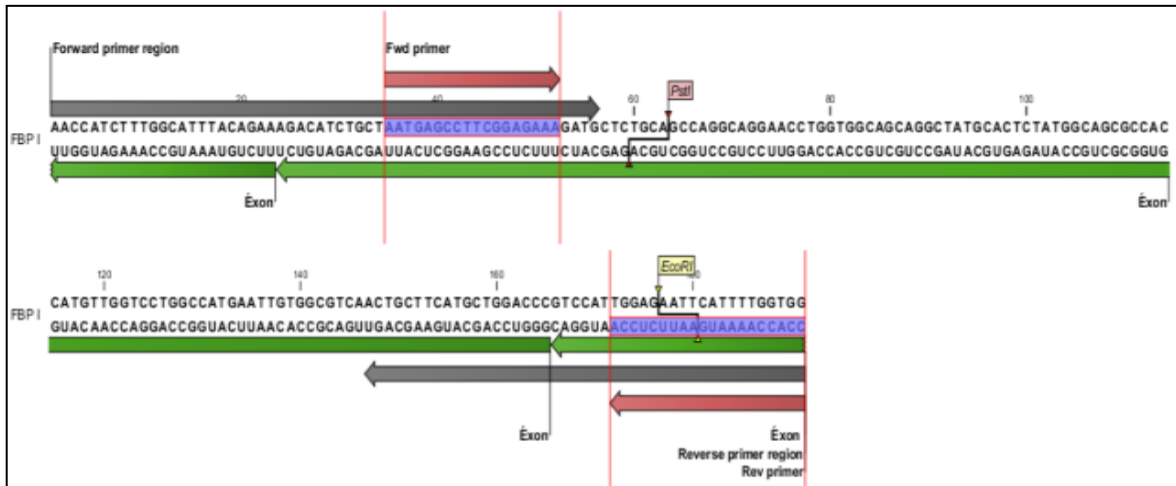
<i>Primer</i>	Amplicon	Junção de Éxons	Enzima de Restrição	Representação
PEPCK1F	182pb	-	PsTI	Figura 2A
PEPCK1R		Sim		
FBP1F	157pb	-	PsTI e EcoRI	Figura 2B
FBP1R				
G6PaseF	242pb	-	BamHI e SaII	Figura 3C
G6PaseR		Sim		
InsulinaF	104pb	Sim	-	Figura 2D
InsulinaR		-		
SGLT2F	201pb	-	EcoRV	Figura 2E
SGLT2R				

Figura 2 – Desenhos dos *primers* para amplificação das enzimas PEPCK-I, FBP-I e G6Pase, do hormônio insulina e do cotransportador renal SGLT2, demonstrando os éxons do mRNA (verde), a região de cada *primer* (cinza) e dentro dela, a sequência específica do *primer* (vermelho), e ainda as enzimas de restrição e seus respectivos pontos de corte. (A) *primers* da PEPCK1; (B) *primers* da FBP1; (C) *primers* da G6Pase; (D) *primers* da Insulina e (E) *primers* do SGLT2.

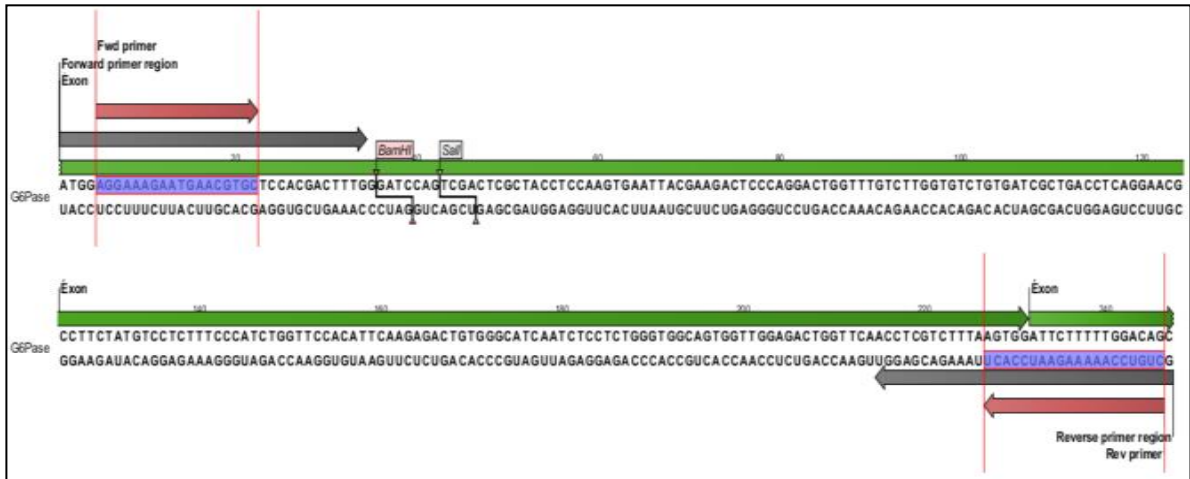
A



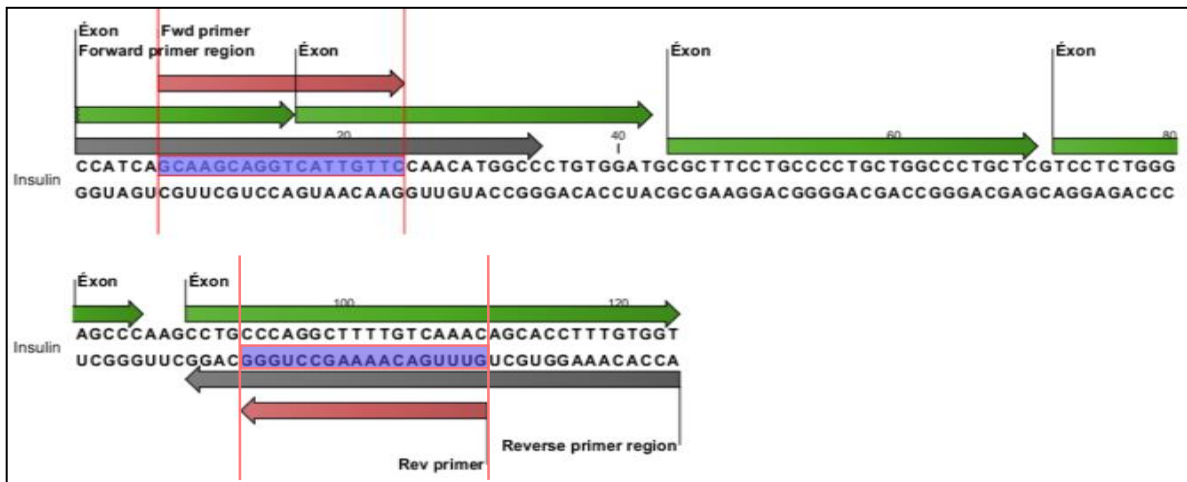
B



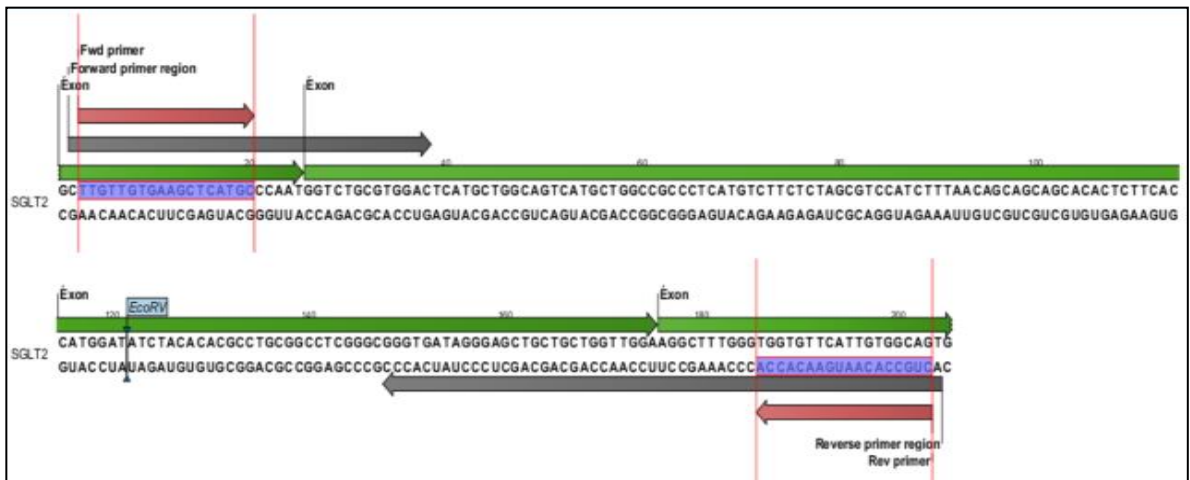
C



D



E



4.2 VALIDAÇÃO DOS PRIMERS

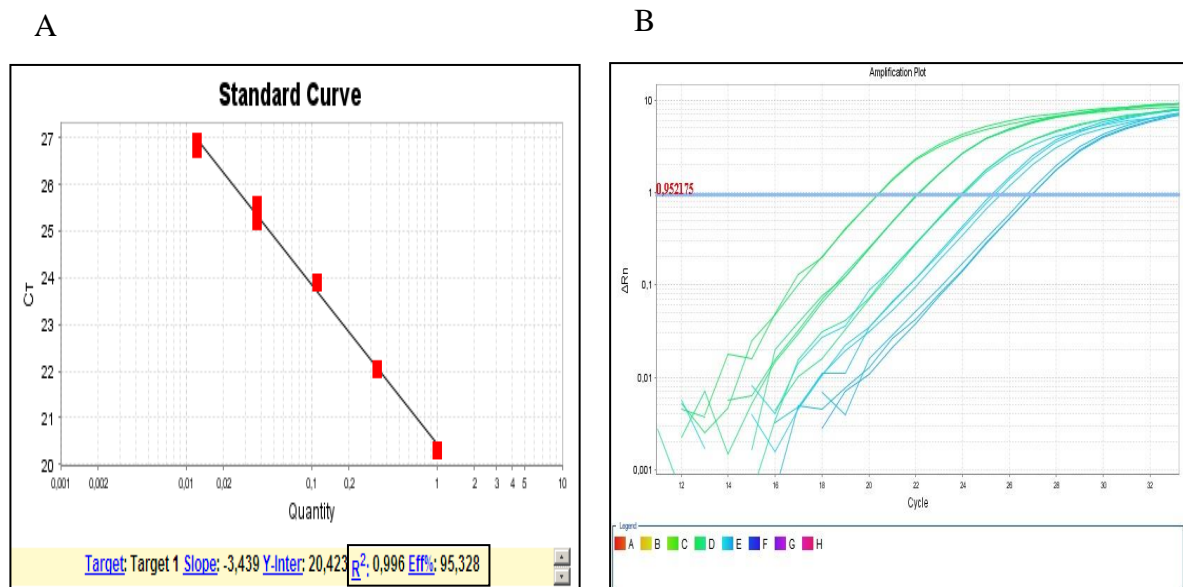
O processo de validação dos *primers* foi realizado por experimentos de curva padrão, pela qual se avaliou a eficiência de amplificação deles. Foram seguidas as recomendações da *Life Technologies*[®], fabricante do equipamento utilizado para o processamento das amostras, que determina o valor de $R^2 \geq 99,0$ e de eficiência o intervalo entre 90 a 110%. Esse processo resultou em três gráficos: 1) gráfico da curva padrão, 2) plot de amplificação e 3) gráfico da Curva de *Melting*.

O *primer* da beta-actina (gene normalizador) foi o primeiro a ser validado utilizando RNA extraído a partir de fígado de rato. Assim, o gráfico da curva padrão desse *primer* apresentou o valor de R^2 igual a 99,6 e de eficiência 95% (Figura 3A), ou seja, aceitáveis segundo a referência do fabricante.

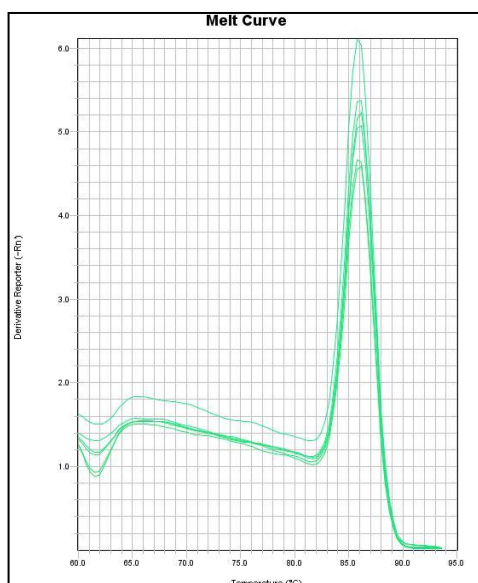
No plot de amplificação se observou os valores do ciclo onde ocorreu a detecção da fluorescência, o que possibilitou avaliar a constância espacial entre as diluições e entre as triplicatas de cada diluição, ambos resultantes da eficiência no preparo das diluições (Figura 3B).

Pelo gráfico da curva de *Melting* foi avaliada a especificidade do produto, sendo que a presença de um único pico demonstrou a amplificação de um produto único (Figura 3C).

Figura 3 – (A) Curva padrão de amplificações por PCR em tempo real do *primer* do gene da beta-actina, em 5 concentrações diferentes (diluição seriada de 1:5 com cDNA de fígado) de cDNA obtido a partir de transcrição reversa de mRNA extraído de fígado de ratos. (B) Plot de amplificação demonstrando a constância espacial entre as três repetições técnicas e entre as cinco diluições. (C) Gráfico da curva de *Melting* com pico único indicando a amplificação de um produto específico.



C



A partir da validação do *primer* da beta-actina, a mesma metodologia foi utilizada para todos os *primers*, conforme os seus tecidos alvos, sendo estes fígado ou pâncreas ou rim. Os resultados obtidos da curva padrão desses *primers* foram então comparados com os da beta-actina, para se avaliar a linearidade e a inclinação da curva da beta-actina com a de cada *primer* alvo. A partir disso, esses *primers* foram tidos como aceitáveis ou não, dependendo da aproximação ou do afastamento dos valores de R^2 e eficiência, que estão elencados na Tabela 1, seguida dos gráficos de Curva Padrão (Figura 4), Plot de Amplificação (Figura 5) e Curva de *Melting* (Figura 6) de cada *primer*.

Tabela 1 – Valores de R^2 e Eficiência dos *primers* obtidos pela curva padrão de cada *primer* conforme seu tecido-alvo.

Tecido	<i>Primer</i>	R^2	Eficiência (%)
Fígado	PEPCK-I	99,0	90,2
	FBP-I	99,9	90,2
	G6Pase	99,2	102,1
Pâncreas	Insulina	99,9	91,8
Rim	SGLT2	99,2	90,2

Figura 4 – Curvas Padrão de ampliações por PCR em tempo real utilizando-se os *primers* dos genes (A) PEPCK-I, (B) FBP-I, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando os valores de R^2 e eficiência.

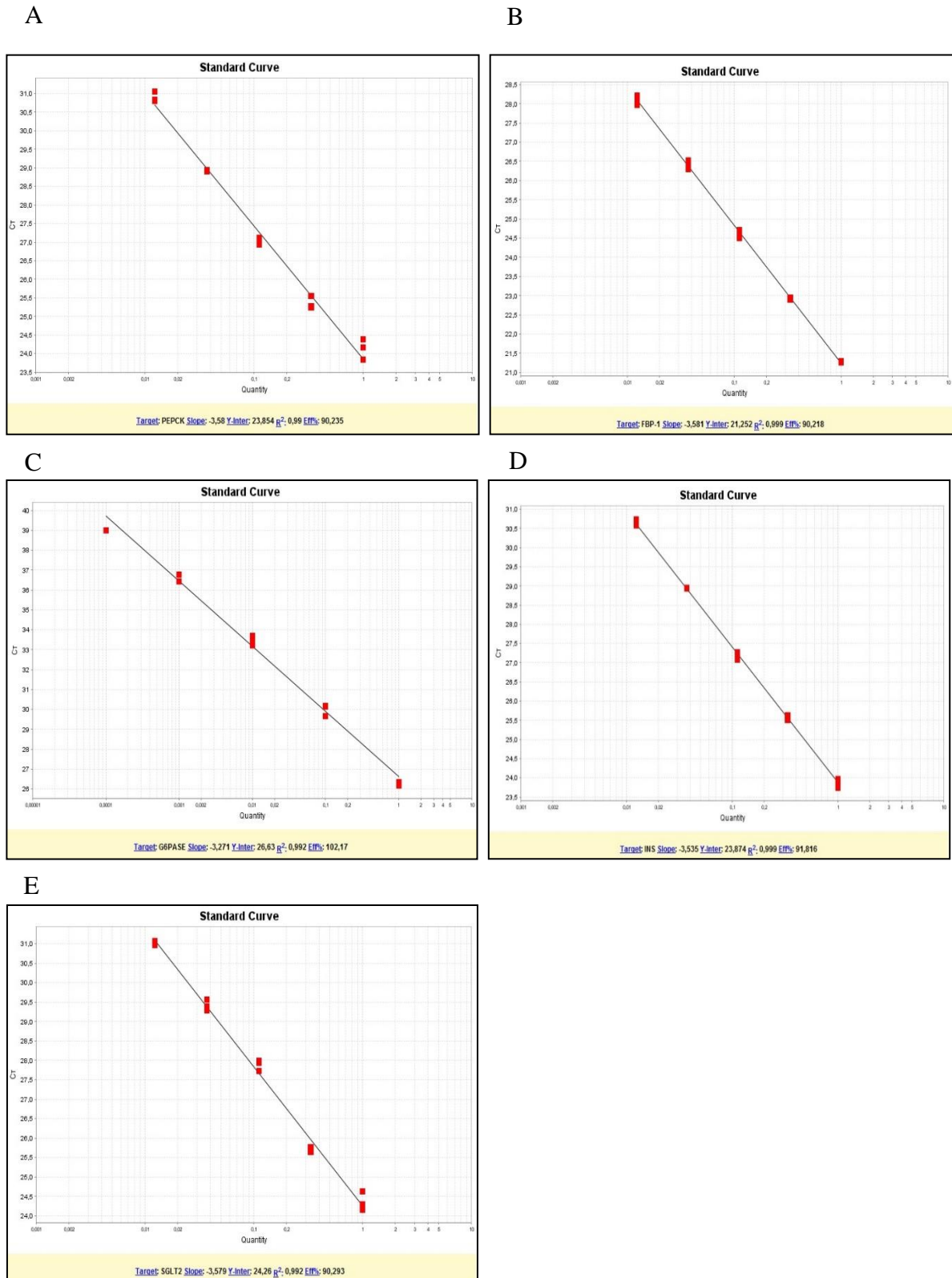


Figura 5 – Plot de amplificação dos *primers* dos genes (A) PEPCK-I, (B) FBP-I, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando a constância espacial entre as réplicas técnicas e as cinco diferentes diluições.

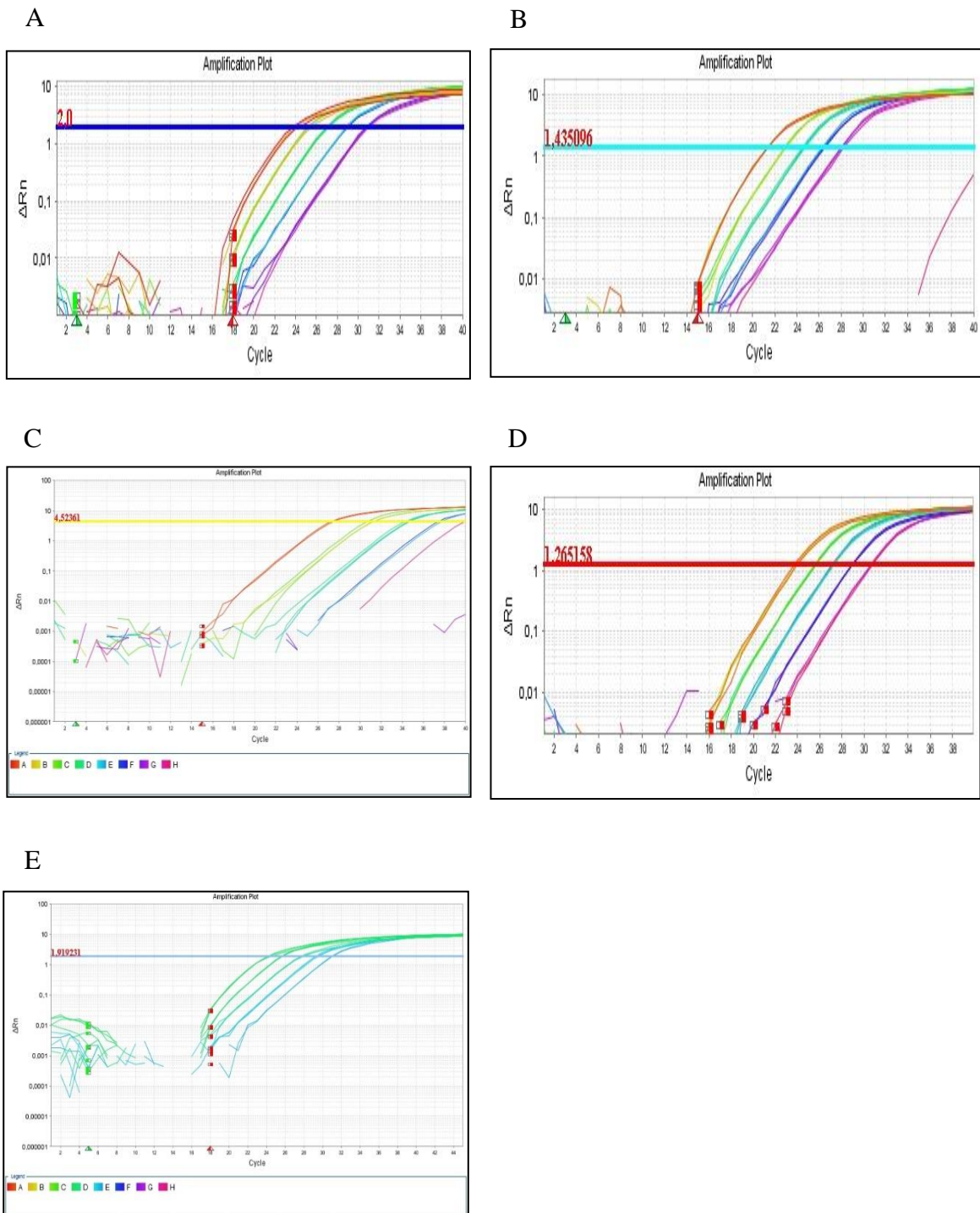
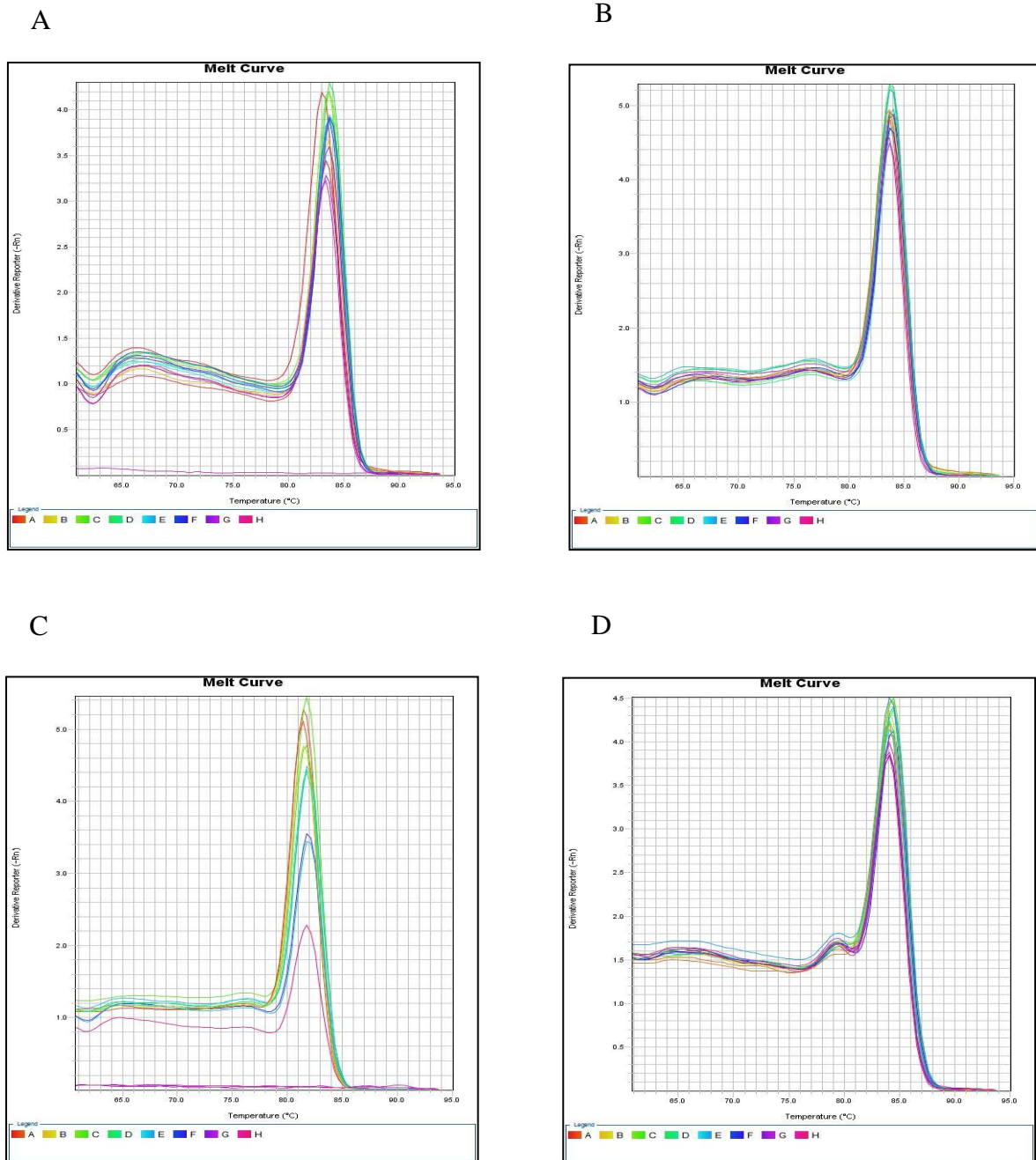


Figura 6 – Curva de *Melting* dos amplicons dos genes (A) PEPCK1, (B) FBP1, (C) G6Pase, (D) Insulina e (E) SGLT2, a partir de cinco concentrações diferentes de cDNA (diluições seriadas de 1:5 com cDNA de fígado e pâncreas; e 1:3 com cDNA de rim) obtido por transcrição reversa de mRNA extraído de fígado (A, B e C), pâncreas (D) ou rim (E) de rato (*Rattus norvegicus*), demonstrando pico único indicativo de amplificação de produto específico.



4.3 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.3.1 Análise de mRNA de fígado

A ação antidiabética dos flavonoides, sua caracterização, melhor biodisponibilidade, dentre outros têm sido largamente pesquisados e os resultados são promissores. Por exemplo, na regulação do metabolismo da glicose já foram identificados muitos alvos como as enzimas glicoquinase (GCK), glicose-6-fosfatase (G6Pase), frutose-1,6-bifosfatase (FBP-1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), glicogênio fosforilase (GP). Dentre os flavonoides que exercem ação sobre as enzimas cita-se:

- A naringina e a hesperidina que inibiram a expressão gênica da PEPCK1 em ratos diabéticos (JUNG et al, 2006).
- A rutina quando administrada oralmente por 45 dias em ratos diabéticos diminuiu a glicemia pela inibição da FBP1 e G6Pase (PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006).
- A quercetina e antocianidinas inibiram de maneira significativa a GP (JAKOBS et al, 2006);
- A EGGG (*Epigallocatequina galato*) diminuiu a expressão da PEPCK1 mediada por PI3K e estimulou a expressão da glicoquinase em ratos diabéticos (ANTON et al, 2007; WOLFRAM et al, 2006).

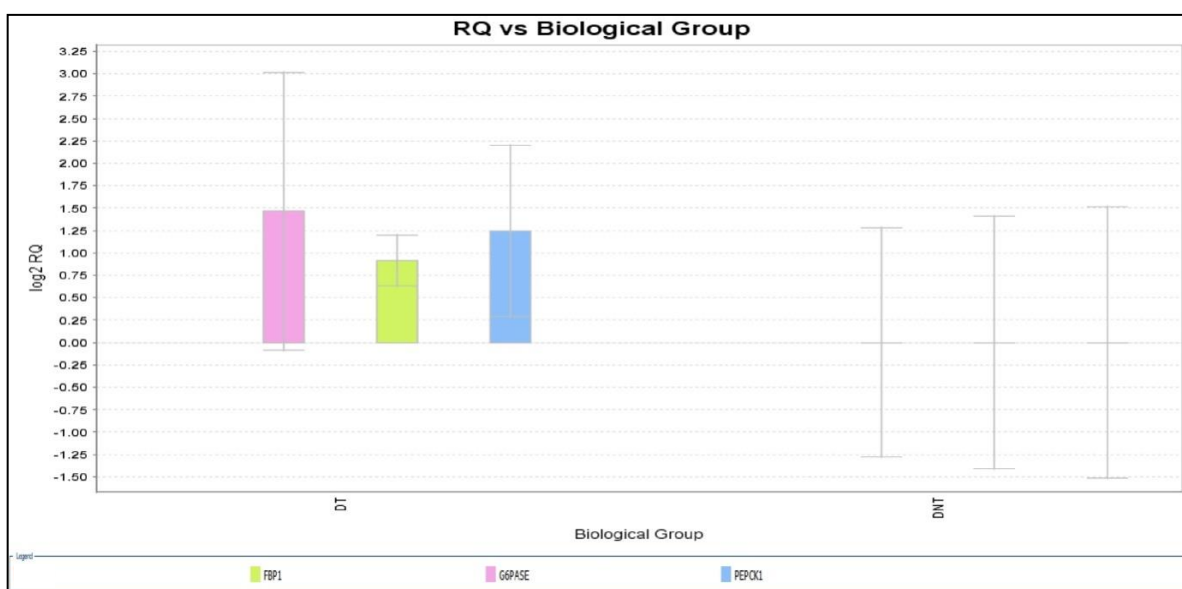
Uma pesquisa realizada por Henriques (2017) avaliou por PCR em tempo real a expressão gênica das enzimas PEPCK1 e G6Pase, utilizando camundongos com diabetes induzida por estreptozotocina tratados durante 14 dias com o extrato bruto de *Bauhinia holophylla* na dose de 400 mg/kg. Como resultado obteve a diminuição da expressão gênica dessas enzimas em comparação ao grupo de diabéticos tratados com salina.

A enzima G6Pase está envolvida no processo de glicólise, bem como no processo de gliconeogênese e nesse, junto com as enzimas PEPCK1 e FBP1 são reguladores chave. A expressão e as atividades dessas enzimas são reguladas pelo glucagon, o qual tem suas ações inibidas pela insulina. Contudo em pessoas com resistência à insulina ou diabetes, nas quais a ação da insulina está diminuída, a inibição da produção de glicose endógena fica comprometida, resultando na permanência da atividade destas (dentre outras) enzimas, que contribuem para o aumento da glicemia sérica, tanto no jejum quanto no estado pós prandial, dificultando ainda mais o seu retorno à normalidade e isso é o que justifica a busca por agentes terapêuticos inibidores dessas enzimas ou que ativem seus inibidores no organismo,

como a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) que é o provável alvo terapêutico da metformina (ANTUNES; BAZOTTE, 2015; TILG; MOSCHEN, 2008; WU et al, 2004).

Realizamos a comparação entre os valores de média e de desvio padrão entre o grupo diabético não tratado (DNT) e o diabético tratado (DT), os quais estão apresentados na figura 7, obtidos na análise das amostras de fígado, utilizando os *primers* específicos para as enzimas PEPCCK1, G6Pase e FBP1, demonstrando que o desvio da média foi grande mesmo com a retirada dos *outliers*, que são aquelas ampliações nas quais o valor do threshold foi desigual ao seu grupo de réplicas técnicas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na expressão gênica dessas enzimas nesses dois grupos. Assim, sugerimos aumentar o número de réplicas biológicas para um estudo mais aprofundado, visto que o grande desvio pode ser reflexo das variações fisiológicas entre os animais dentro de cada tratamento, o que dificultaria a observação de diferenças significativas entre os tratamentos.

Figura 7 – Gráfico da quantificação relativa (\log_2 RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de fígado para avaliar a expressão gênica das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1 (PEPCK1), Glicose-6-fosfatase (G6Pase) e frutose-1,6-bifosfatase (FBP1).



4.3.2 Análise de mRNA de pâncreas

A insulina medeia a inibição das vias metabólicas de degradação do glicogênio e de síntese de glicose endógena, ativadas pelo hormônio glucagon. Em condições de resistência insulínica, o tecido muscular tem diminuído a captação, a utilização e o armazenamento de glicose. O tecido hepático tem aumentado a produção excessiva de glicose hepática, contribuindo para a hiperglicemia nos períodos pós prandial e jejum (BASU et al, 2013; CHUNG et al, 2014).

O controle inicial da resistência insulínica ou do diabetes abarca uma mudança no estilo de vida, como a adoção de dieta saudável e exercícios físicos regulares. Mas em muitos casos a redução da hiperglicemia ocorre por meio de terapias medicamentosas, dentre as quais estão as classes de sensibilizadores e de secretagogos (FERREIRA; CAMPOS, 2014).

Tratamento opcional tem sido buscado por meio de produtos nutracêuticos, que combinam nutrientes e fármacos definindo-se como “qualquer suplemento não tóxico de extrato de alimentos que tenha benefícios de saúde cientificamente comprovados para o tratamento e a prevenção de doença”; a exemplo desses têm-se os flavonoides (WILLIAMS; GRAYER, 2004) que variam em número nas plantas, a depender da espécie, do órgão, fase de desenvolvimento e condições ambientais (DEBEAUJON et al, 2001), e nos alimentos conforme o preparo e processamento (EWALD et al, 1999).

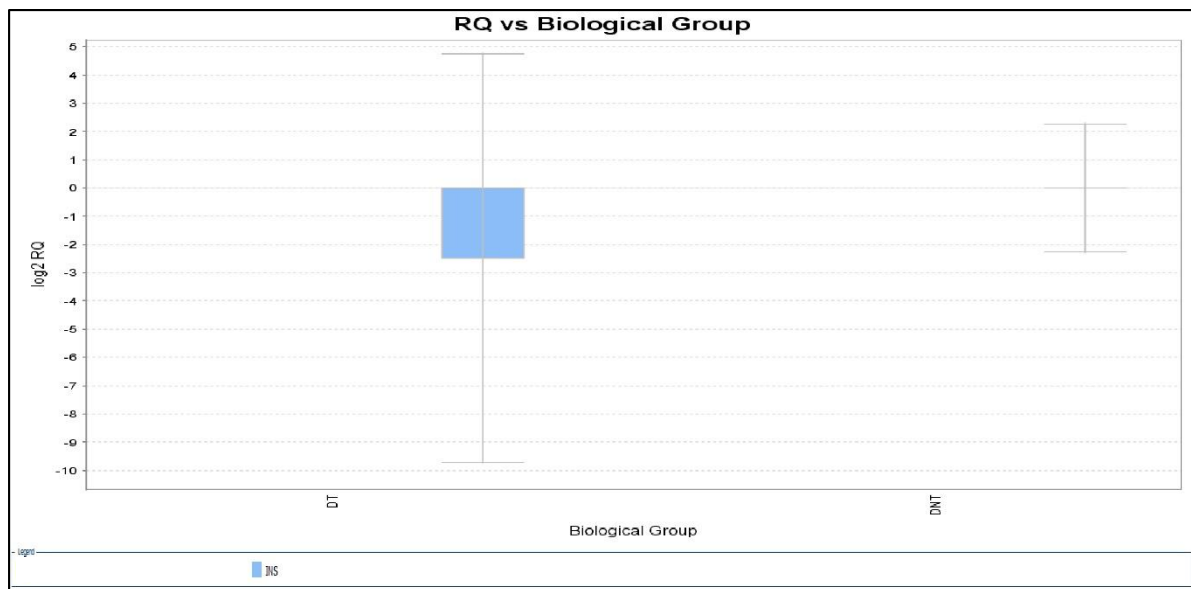
Uma revisão de literatura realizada por Valle (2016) analisou o efeito dos flavonoides na resposta glicêmica e insulinêmica, a partir de 29 artigos com o tema flavonoides e absorção de carboidratos, sendo que desses, sete foram realizados em humanos (saudáveis e diabéticos tipo 2) e os demais em ratos (normais/hiperglicêmicos ou diabéticos induzido ou por drogas ou pelo consumo de dieta rica em gordura). Dos diversos efeitos produzidos pelos flavonoides como resultados encontrados nos 29 artigos, em quatro deles foi descrito o aumento da secreção de insulina e em três foi relatado a diminuição da resistência a esse hormônio. A partir desses e dos outros artigos avaliados, Valle concluiu que os flavonoides influenciam na biodisponibilidade dos carboidratos e na homeostasia da glicose, seja na forma isolada ou pela ingestão de extratos de plantas ou frutas que os contenham, devido aos efeitos hipoglicemiantes pelo aumento da sensibilidade insulínica e/ou pela inibição intestinal da absorção de glicose, tanto em humanos quanto em ratos.

Nagao e colaboradores (2008) avaliaram indivíduos com diabetes tipo 2 e a partir de intervenção oral de uma bebida rica em catequina, um polifenol presente no chá verde,

verificaram por análise bioquímica do sangue que houve, dentre outras melhoras, o aumento dos níveis de insulina desses indivíduos.

A média e o desvio padrão do grupo diabético não tratado foram comparados com os do grupo diabético tratado com a nanodispersão de *B. reticularia* (figura 8) para se avaliar a expressão gênica da insulina, a partir de amostras de pâncreas. O desvio da média foi grande e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na expressão do gene da insulina.

Figura 8 – Gráfico da quantificação relativa (\log_2 RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de pâncreas para avaliar a expressão gênica da insulina (INS).



4.3.3 Análise de mRNA do rim

Diminuir a reabsorção renal de glicose pela inibição do cotransportador de sódio e glicose SGLT2 é o mecanismo de ação dos chamados inibidores do SGLT2, resultando na diminuição do limiar de reabsorção, no aumento da excreção de glicose e na redução de seu nível plasmático, sem causar hipoglicemia (SCHEEN, 2015; CEFALU; RIDDLE, 2015). Nesse sentido, são desenvolvidas pesquisas com plantas medicinais que, dentre outras vias, também atuem por esse mecanismo.

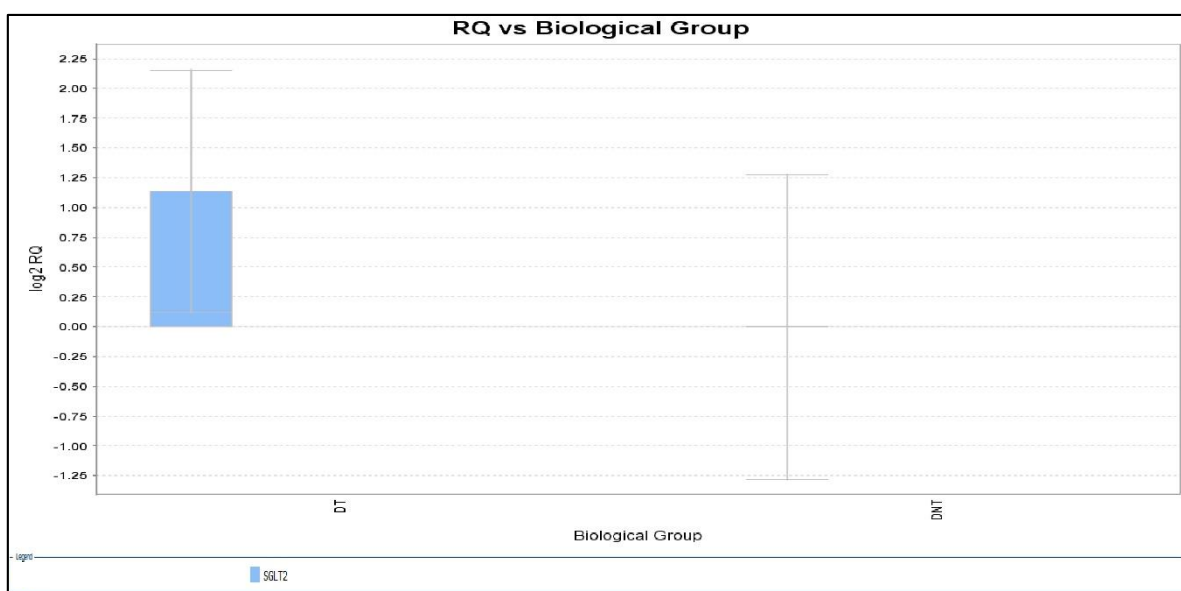
Li e colaboradores (2006) realizaram uma pesquisa tratando coelhos e ratos diabéticos com o flavonoide naringenina, resultando na inibição tanto da captação de glicose no intestino quanto da sua reabsorção no rim. A partir disso, concluíram que o mecanismo de ação da naringenina foi o bloqueio do cotransportador de sódio/glicose SGLT.

Sato e colaboradores (2007) realizaram um estudo com o extrato metanólico de *Sophora flavescens* e a partir dos resultados concluíram que houve inibição do cotransportador de sódio/glicose SGLT. Após isolarem nove flavonoides: maackiaina, pterocarpina, variabilina, formononetina, kurarinona, kushenol, sophoraflavanona e kuraridina, testaram o potencial inibitório de todos eles sobre SGLT. Quatro desses flavonoides (kurarinona, kushenol, sophoraflavanona e kuraridina) inibiram fortemente os cotransportadores SGLT1 e SGLT2. Também observaram que os flavonoides com grupo hidroxila tendem a inibir mais fortemente o SGLT2 do que o SGLT1. Concluíram a respeito da necessidade de investigação desses flavonoides como opção para o desenvolvimento de novos inibidores do cotransportador SGLT2.

O *Acer nikoense* é uma planta medicinal utilizada no Japão para tratar distúrbios hepáticos e doenças oculares (NAGAI et al, 1978). Em 2010, Morita et al avaliaram quatro compostos isolados da casca dessa planta e dezesseis derivados relacionados na atividade inibitória de SGLT. Diarrepanoides cíclicos e a acerogenina A e B apresentaram inibição acentuada para ambos SGLT1 e SGLT2. Outros compostos isolados não apresentaram inibição suficiente. A partir desses e de outros resultados obtidos nesse estudo, conclui-se a respeito desses compostos isolados e de seus derivados que a posição e/ou da presença de um grupo hidroxila nas posições C-9 ou C-11, bem como a sua estereoquímica, podem não estar relacionadas a inibição dos cotransportadores.

Do resultado da quantificação relativa do cotransportador de sódio e glicose SGLT2 realizada em amostras de rim foi feita a comparação da média e do desvio padrão do grupo diabético não tratado com o grupo diabético tratado (figura 9). O desvio padrão da média foi grande e não houve diferença significativa ($p > 0,05$, teste *t* de Student) na expressão gênica do cotransportador SGLT2, tanto no grupo controle quanto no tratado.

Figura 9 – Gráfico da quantificação relativa (\log_2RQ) em função do grupo diabético não tratado (DNT, com N = 6) e do diabético tratado (DT, com N = 5), determinando o valor da média (barra) e do desvio padrão (linha), a partir do processamento de amostras de rim para avaliar a expressão gênica do cotransportador de sódio e glicose (SGLT2).



4.4 AÇÃO ANTIDIABÉTICA DAS PLANTAS

Os efeitos benéficos das frutas e hortaliças não se restringem à presença das vitaminas, das fibras e dos minerais, mas também de outros compostos dentre os quais estão os flavonoides, amplamente estudados por modular respostas fisiológicas. Exercem, por exemplo, influência na biodisponibilidade dos carboidratos e na homeostasia da glicose, sendo por isso fontes alternativas ao tratamento de doenças como o diabetes (CAZAROLLI et al, 2008).

Além das enzimas hepáticas, da insulina e do cotransportador de sódio e glicose, outras moléculas são responsivas aos flavonoides, dentre os quais estão os transportadores do tipo GLUT. A ação dos flavonoides em músculo sóleo se dá tanto pelo aumento na expressão gênica do GLUT4 (LIU et al, 2006) quanto pela captação *in vitro* de glicose (UEDA et al, 2008); pela ativação do GLUT4 via PI3K (LEE et al, 2010); pelo estímulo da expressão e

translocação do GLUT4 em músculo esquelético (ONG et al, 2011) e em tecido adiposo (WU et al, 2004).

Outro mecanismo de ação dos flavonoides que gera efeito hipoglicemiante se relaciona a inibição das enzimas α -glicosidase e a α -amilase, que atuam na degradação e na limitação da digestão dos carboidratos, respectivamente, e isso diminui a absorção da glicose. Além desse, há ainda a inibição do cotransportador de sódio e glicose SGLT1 presente no epitélio intestinal. Ou seja, a inibição de enzimas e transportadores que possibilitam a quebra e a absorção de glicose são formas que limitam sua entrada excessiva no estado pós prandial (WILLIAMSON, 2013).

Uma pesquisa com uma nanodispersão de *Baccharis reticularia*, a partir de um ensaio de inibição da enzima α -amilase, obteve como resultado uma inibição da referida enzima, quando utilizada na concentração $> 1\text{mg/ml}$. Outro resultado dessa pesquisa foi o isolamento dos seguintes flavonoides: apigenina, diosmetina, eriodictiol, hispidulina, naringenina, nepetina e patuletina (D`HAVELOOSE; CRUZ, 2017). Além da *B. reticularia*, outras espécies desse gênero são utilizadas como antidiabéticos (ZDERO et al, 1989).

Hocayen e colaboradores (2016) utilizaram como suplementação crônica o extrato metanólico de *Baccharis dracunculifolia* em ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico e avaliaram parâmetros bioquímicos, a atividade antioxidante, a totalidade de compostos fenólicos e a secreção insulínica pelas ilhotas pancreáticas. Como resultados, encontraram o aumento em 30% da concentração sérica de insulina, em 33% da sua secreção e o efeito protetor sobre a perda de massa celular das ilhotas pancreáticas.

Efeitos anti hiperglicêmico e de aumento na secreção da insulina foram reportados por um estudo com ratos hiperglicêmicos utilizando o extrato bruto e n-butanol, e frações residuais aquosas de *Baccharis articulata*. Os alvos investigados foram: níveis séricos de glicose, secreção de insulina, conteúdo de glicogênio hepático e muscular e a ação in vitro, tanto na atividade da dissacaridase intestinal quanto na glicação da albumina. Dentre outros resultados, o estímulo da secreção de insulina e o aumento do conteúdo do glicogênio hepático e muscular resultaram da ingestão oral da fração n-butanol, que segundo o próprio estudo, contém alta concentração de flavonoides, contudo não houve o isolamento destes (KAPPEL et al, 2012).

5 CONCLUSÃO

Os resultados relativos ao desenho dos *primers* foram satisfatórios, visto que todos eles apresentaram especificidade, boa reprodutibilidade, opções de tratamento do amplicon com enzimas de restrição e eficiência/ R^2 dentro do preconizado para esse tipo de ensaio. Por conseguinte, esses *primers* poderão ser utilizados em outros estudos que objetivem investigar a expressão gênica desses alvos, contribuindo para o aumento das opções de pesquisa molecular destes. Quanto a investigação molecular do mecanismo de ação da nanodispersão da fração flavonoídica de *B. reticularia* utilizada para o tratamento experimental de ratos com diabetes induzido por aloxano, não houve o seu estabelecimento em nenhum dos tecidos analisados, por meio dos cinco alvos: as enzimas hepáticas fosfoenolpiruvato carboxiquinase-1, frutose-1,6-bifosfatase-1 e glicose-6-fosfatase; o hormônio pancreático insulina; e cotransportador renal de sódio-glicose SGLT2. Diante disso, sugere-se a continuação da investigação molecular a partir da busca de outros alvos, utilizando inclusive os mesmos tecidos e metodologia, considerando, contudo, as adequações necessárias que assegurem a amplificação dos novos alvos.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Inhibitor of renal glucose control in type 2 diabetes. **Endocrine Practice**, v.14, n.6, p.782-90, 2008.
- AMERICAN DIABETE ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 40, n. 1, p. 11–24, 2017.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 35, n. 1, p. 64–71, 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Métodos e critérios para o diagnóstico, p.11-12, 2015.
- ANTON, S.; et al. Epigallocatechin gallate (EGCG) mimics insulin action on the transcription factor FOXO1a and elicits cellular responses in the presence and absence of insulin. **Cell Signal**, v. 19, n. 2, p. 378 – 83, 2007.
- ANTUNES, M. M.; BAZOTTE, R. B. Efeitos da Metformina na resistência insulínica: aspectos fisiopatológicos e mecanismos de ação farmacológica. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v.10, n.3, p. 105-112, 2015.
- AZEVEDO, C. R.; et al. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 11, p. 1435-44, 2006.
- BABU, P. V.; et al. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 11, p. 1777-1789, 2013.
- BAEKESKOV, S.; et al. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. **Nature**, v. 347, p. 151-6, 1990.
- BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Metformin. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, p. 574-9, 1996.
- BASU, R.; et al. Patogênese do pré-diabetes: papel do fígado na hiperglicemia de jejum isolada e hiperglicemia combinada de jejum e pós-prandial. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 98, p. 409 – 417, 2013.
- BELTRAME, F. L.; et al, O. Estudo fitoquímico e avaliação do potencial antidiabético do *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). **Química. Nova**, vol.24, n.6, p.783-785, 2001.
- BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects. 2nd edition. editors. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.
- BERG, J. M.; et al. Bioquímica. 5ed. Rio de Janeiro: **Guanabara-Koogan**, 2004.
- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. de S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia*, **Série Botânica**, v. 63, n. 2, p. 263-77, 2008.
- BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**, 2017.

- BRASIL, Ministério da Saúde. **Biblioteca Virtual em Saúde**, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diabetes mellitus – **Cadernos de Atenção Básica** n. 16, 2006. Disponível: <http://bvsmis.saude.gov.br/dicas-em-saude/2052-diabetes>
- BREWER L.R., et al. Wheat bran particle size influence on phytochemical extractability and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 152, p. 483-90, 2014.
- CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429-40, 2008.
- CEFALU, W. T.; RIDDLE, M. C. Evolving Tactics With Inhibition of Sodium–Glucose Cotransporters SGLT2 Inhibitors: The Latest “New Kids on the Block”! **Diabetes Care**, v. 38, n. 3, p. 352 – 354, 2015.
- CERSOSIMO, E. A Importância do Rim na Manutenção da Homeostase da Glicose: Aspectos Teóricos e Práticos do Controle da Glicemia em Pacientes Diabéticos Portadores de Insuficiência Renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 26, n. 1, 2004.
- CHUNG, S. T, et al. Aumento da gluconeogênese em jovens com diabetes tipo 2 diagnosticada recentemente. **Diabetologia**, v. 58, p. 596-603, 2014.
- CZECHOWSKI, T.; et al. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 5-17, 2005.
- D`HAVELOOSE, N. P.; CRUZ, R. A. S. Nanodispersões de flavonoides de *Baccharis reticularia* DC com atividade inibidora da α -amilase. Ciências da Saúde: resultados dos projetos de iniciação científica da Universidade Federal do Amapá (2012-2016), p. 209-21, 2017.
- DEAN, L.; MCENTYRE, J. The genetic landscape of diabetes. Bethesda (MD): **National Center for Biotechnology Information** (US); 2004. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1671/> Acesso em: dez. 2017
- DEBEAUJON, I.; et al. The transparent testa12 gene of arabidopsis encodes a multidrug secondary transporter-like protein required for flavonoid sequestration in vacuoles of the seed coat endothelium. **Plant Cell**, v. 13, p. 853–871, 2001.
- DEFRONZO, R. A.; et al. International Textbook of Diabetes Mellitus. 4 Ed. **Wiley-Blackwell**, 2015.
- DE MARIA, C. A. B.; et al. Bioquímica do diabetes. 1 ed. 2011.
- EWALD, C.; et al. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, v. 64, p. 231–235, 1999.
- FERREIRA, V. A.; CAMPOS, S. M. B. Avanços farmacológicos no tratamento do diabetes tipo 2. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. [s/n], p. 72. 2014.
- GIBAS, C.; et al. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia**. Rio de Janeiro: Campus, 2001.
- GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMES, M. B.; COBAS, R. Diabetes mellitus. In GROSSI, S. A. A.; PASCALI, P. M., organizadoras. **Cuidados de Enfermagem em Diabetes Mellitus**. São Paulo: A. C. Farmacêutica; p.1-12. 2011.

GREGG, E. W.; et al. The changing face of diabetes complications. **Lancet Diabetes Endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 537-47; 2016.

Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. **Applied Biosystems**, 2014. Available in: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042380.pdf. Acesso Jan. 2018

GUYTON, N. A. C.; HALL, J. E. **Fundamentos de Fisiologia** - 13 ed. Elsevier, 2017.

GUYTON, N. A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: 12 ed. Elsevier, 2011.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada.**, 5 ed. Artmed, 2012.

HAYASHI, T.; et al. Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. Denmark. **The American Physiological Society**, p. 1849 – 1897, 1997.

HEDIGER, M. A.; et al. Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and Escherichia coli Na⁺/proline cotransporters. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 86, n. 15, p. 5748 – 5752, 1989.

HENRIQUES, N. AP. de P. C. Investigação dos mecanismos de ação hipoglicemiante do extrato bruto de *bauhinia holophylla* em fígado e músculo esquelético de camundongos diabéticos tipo 1 induzidos por estreptozotocina, 2017, 96p. Instituto de Biociências, Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista.

HIGUCHI, R.; et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026 – 30, 1993.

HOCAYEN, P de A. S.; et al. Baccharis dracunculifolia methanol extract enhances glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets of monosodium glutamate induced-obesity model rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, ed 7, 2016.

HUO, Y.; et al. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formulae. **Phytotherapy Research**, London, v. 17, p. 48 – 55, 2003.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Diabetes Atlas. **E-library**, 8 ed. 2017.

JAKOBS, S.; et al. Natural flavonoids are potent inhibitors of glycogen phosphorylase. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 50, n. 1, p. 527, 2006.

JOHNSTON, R.; et al. Canagliflozin, dapagliflozin and empagliflozin monotherapy for treating type 2 diabetes: systematic review and economic evaluation. Health Technology Assessment, No. 21. Southampton (UK): **NIHR Journals Library**; p. 23-29, Jan, 2017.

JUNG, U. J.; et al. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 38, n. 7, p.1134 – 45, 2006.

- KAHN, C. R.; et al. **Joslin: Diabetes Melito**. 14 Ed. 2009.
- KAPPEL, V. D.; et al. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6754-68, 2012.
- KATZER, J. I. Diabetes mellitus tipo II e atividade física. **Revista Digital**. Buenos Aires. n. 113, p. 5-9, 2007.
- KUBISTA, M.; Et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects Medicine Journal**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.
- KUMAR, S.; et al. Enzymes Inhibitors From Plants: Na Alternate Approach To Treat Diabetes. **Pharmacogn Communications**, v. 2, n. 2, p. 18-33, 2012.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal**, p. 1-16, id. 162750, 2013.
- LAN, M. S et al. A transmembrane protein of the protein tyrosine phosphatase family, is a major autoantigen in insulin-dependent diabetes mellitus. **Proceedings of the National Academy Sciences, USA**, v. 93, p. 6367-70, 1996.
- LAUBE, H. Acarbose: an update of its therapeutic use in diabetes treatment. **Clinical Drug Investigation**, v. 22, p. 141 – 156, 2002.
- LAZARY, V. M. D. **Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama**. [Monografia]. Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM da Universidade de Brasília. Brasília, 2010.
- LEE, H. H.; et al. Effect of pycnogenol on glucose transport in mature 3T3-L1 adipocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 8, p. 124 – 29, 2010.
- LI, J. M.; et al. Inhibition of intestinal and renal Na⁺-glucose cotransporter by naringenina. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v. 38, n. 5-6, p. 985-95, 2006.
- LI, Y.; et al. Effects of tea or tea extract on metabolic profiles in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of ten randomized controlled trials. **Diabetes Metabolism Research and Reviews**, Jan, v. 32, n. 1, p. 2-10; 2016.
- LIU, I. M.; et al. Mediation of β -endorphin by myricetin to lower plasma glucose in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, n. 12, p. 199-206, 2006.
- LIVAK, K. J.; .SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Elsevier**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.
- LOBO, A. M. B. O.; LOBO, R. N. B. Considerações Estatísticas na Análise de Dados de Expressão gênica Gerados pela Técnica de RT-qPCR. **Embrapa Caprinos e Ovinos Documentos (INFOTECA-E)**, Sobral, 2014.
- LOPES, R. M.; et al. Flavonoides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14. P. 18-22, 2010.
- LUCHS, A. Transdução de Sinal: um olhar sobre a insulina. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 157-164, 2006.

- MA, Q. Flavonoids from the Pericarps of *Litchi chinensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 1073-1078, 2014.
- MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.
- MARASCHIN, J. F.; et al. Classificação do Diabetes Mellito. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 2, p. 40 – 47, 2010.
- MARTINS, M. M. **Exercício Físico no controle do Diabetes Mellitus**. Guarulhos, São Paulo: Porte editora, 2000.
- MAZID, M.; et al. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology Medicine**, v. 3, n. 2 p. 232–49; 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica: Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica Diabetes Mellitus. Ministério da Saúde | Secretaria de Atenção à Saúde | Departamento de Atenção Básica, **Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde**, Brasília-DF, n. 36, 2013. Disponível em: www.saude.gov.br/bvs. Acesso: Nov 2017
- MORITA, H.; et al. Cyclic diarylheptanoids as Na⁺-glucose cotransporter (SGLT) inhibitors from *Acer nikoense*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 1070-4, 2010.
- NAGAI, M.; et al. Studies on the constituents of Aceraceae plants. II. Structure of aceroside I, a glucose of a novel cyclic diarylheptanoids from *Acer nikoense* Maxim. **Chemical Pharmaceutical Bulletin** (Tokyo), v. 26, n. [s/n], 2805–2810, 1978.
- NAGAO, T.; et al. Catechin-rich Beverage Improves Obesity and Blood Glucose Control in Patients With Type 2 Diabetes. **Obesity**, v. 17, n. [s/n], p. 310–317, 2008.
- NEGRI, G. Diabetes mellito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 121-142, 2005.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed**, ed. 6; 2014.
- NEUMILLER, J. J.; et al. Sodium-glucose cotransport inhibitors: progress and therapeutic potential in type 2 diabetes mellitus. **Drugs**. v. 70, n. 4, p. 377-85, 2010.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciências e Desenvolvimento**, v. 33, n. [s/n], p. 10–13, 2004.
- OLIVEIRA, A. C; et al. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. **Journal Ethnopharmacology**. v. 102, n. 3, p. 465-469, 2005.
- ONG, K. W.; et al. Polyphenols-rich *Vernonia amygdalina* shows anti-diabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 598-607, 2011.
- ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. de C. **Sistema digestório: integração básico-clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.

OWEN, O. E.; et al. Liver and kidney metabolism during prolonged starvation. **Journal Clinical Investigation**, v. 48, n. 3, p. 574 – 83, 1969.

PAN D, et al. LW-214, a newly synthesized flavonoid, induces intrinsic apoptosis pathway by down-regulating Trx-1 in MCF-7 human breast cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 598-610, 2014.

PAOLACCI, A. R. et al. Identification and validation of reference genes for Quantitative RT PCR normalization in wheat. **BMC Molecular Biology**, v10, n. [s/n], p.11, 2009.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor – a critical link in glucose homeostasis and insulin action. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. [s/n], p. 89-109, 1998.

PENA, F. P. da S. **Resiliência e qualidade de vida de pessoas com diabetes mellitus a luz da promoção da saúde**, 2017. 190p. Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

PEPATO, M. T.; et al. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 37, n. [s/n], p. 15-20, 2003.

PERICLEOUS, M.; et al. Nutrition and pancreatic cancer. **Anticancer Research**, v. 34, n. 1, p. 9-21, 2014.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**, v. 106, n. [s/n], p. 165-9, 2000.

PIRIE A.D., et al. Hypolipidaemic effect of crude extract from *Carpobrotus rossii* (pigface) in healthy rats. **Food and Chemical Toxicology**; v. 66; p. 134-139; 2014.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 96 - 102, 2006.

RODRIGUES, L. S.; et al. Flavonoides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta Toxicológica Argentina**; v. 23; n. 1, 2015.

SAAD, M. J.; et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, 22100-4, 1996.

SAID, O.; et al. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan Heights and the West Bank Region. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 83, n. [s/n], p. 251-265, 2002.

SANTOS, E. A. et al. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA AMBIENTE NA ANÁLISE DO TERMOCICLADOR. **XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, n. [s/n], p. 1522–1525, 2014.

SANTOS, H. B.; et al. Avaliação do efeito hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em estudos clínicos fase II. **Revista brasileira de farmacognosia**. v.18 n.1, Mar. 2008.

- SATO, S.; et al. Na⁺-Glucose cotransporter (SGLT) inhibitory flavonoids from the roots of *Sophora flavescens*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. [s/n], n. 3445–3449, 2007.
- SCHEEN, A. J. Farmacodinâmica, eficácia e segurança dos inibidores do transportador de sódio- glicose tipo 2 (SGLT2) para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2. **Drogas**, v. 75, n. 1, p. 33 – 59, 2015.
- SCHMIDT, M. I. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **The Lancet**, v. 377, n. 9781, p.1949-61, 2011.
- SCHREUDER, T. H.; et al. Effect of black tea consumption on brachial artery flow-mediated dilation and ischaemia-reperfusion in humans. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**; v. 39; n. 2; p. 145-151, 2014.
- SILVARES, R. R.; et al. Combined therapy with metformin and insulin attenuates systemic and hepatic alterations in a model of high-fat diet-/streptozotocin-induced diabetes. **International Journal of Experimental Pathology**, v.97, n. 3, p. 266 – 77, 2016.
- SILVEIRO, P. S.; SATLER, F. **Rotinas em endocrinologia**. Ed. Artmed, 2015.
- SKYLER, J. S.; et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **Diabetes**, v. 66, n. [s/n] p 241–255, 2017.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretriz, São Paulo, Ed. Clannad, 2017-2018.
- SOUSA, M. P; et al. **Constituintes Químicos Ativos e Propriedades Biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras**. Ed. UFC, p. 416, 1991.
- STORGAARD, H.; et al. Benefits and Harms of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**. Nov v. 11, n. 11, p. 0166125, 2016.
- SZKUDELSKI, T. Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. **Experimental Biology Medicine**, v. 237, n. 5, p. 481–90. Disponível em: <http://ebm.sagepub.com/content/237/5/481.full>, 2012. Acesso Set. 2017.
- TARAPUES, M.; et al. Association of musculoskeletal complaints and gliptin use: review of spontaneous reports. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 22, n. [s/n], p. 1115–1118, 2013.
- TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 371, p. 9, 2008.
- TODOROVA, M.; TRENDAFLOVA, A. *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152; n. 2; p. 256-265, 2014.
- TORREZAN, R.; et al. Treatment with isoflavones replaces estradiol effect on the tissue fat accumulation from ovariectomized rats. **Arquivos Brasileiros Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 9, p. 1489-1496, 2008.

- TORTORA, G. J.; GRABOWSKI, S. R. **Principles of Anatomy and Physiology**. 10 ed. Wiley, 2003.
- TYRRELL, D. A. J. Polymerase chain Reaction. **British Medical Journal**, v. 324, n. 4, p. 4–9, 1997.
- UEDA, M.; et al. Epigallocatechin gallate promotes GLUT4 translocation in skeletal muscle. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 377, n. 1, p. 286 – 90, 2008.
- ULDRY, M.; THORENS B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. **Pflugers Arch European Journal of Physiology**, v. 447, n. 5, p. 480 – 489; 2004.
- VALASEK, M. A, REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 151-9; 2005.
- VALLE, I. F. A do. **Análise do efeito dos flavonoides na resposta glicêmica e insulinêmica**: uma revisão de literatura. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição, 2016.
- VAREDA, P. M. P.; et al. *Myrcia bella* Leaf Extract Presents Hypoglycemic Activity via PI3k / Akt Insulin Signaling Pathway. **Evidence-based Complementary Alternative Medicine**, v. 1–10, 2014.
- VASCONCELOS, C. F. B.; et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1533–41, 2011.
- VEIGA JÚNIOR, V. F.; et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.
- VIANA, G. S. B.; et al. Hypoglycemic and anti-lipemic effects of the aqueous extract from *Cissus sicyoides*. **BMC Pharmacology**, v. 4, n. 9, 2004.
- WANG, X.; et al. Effects of green tea extract on insulin sensitivity and glycaemic control in populations at risk of type diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of Human Nutrition Dietetics**, v. 27, n. 5, p. 501-12, 2014.
- WHALEN, K.; et al. The Role of Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. **Clinical Therapeutics**, Jun, v. 37, n. 6, p. 1150-66, 2015.
- WILLIAMS, C. A.; GRAYER, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Reports**, v. 21, n. [s/n], p. 539 – 573, 2004.
- WILLIAMSON, G. Possible effects of dietary polyphenols on sugar absorption and digestion. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, n. 1, p. 48-57, 2013.
- WITTERS, L. The blooming of the French lilac. **Journal Clinical Invest.** v. 108, n. 8, p. 1105–7, 2001.
- WOLFRAM, S.; et al. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. **Journal Nutrition**, v. 136, n. 10, p. 25128, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **WHO/NCD/NCS/99.2**, Geneva: 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy**, 2013. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85975/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf;jsessionid=845EE9DE798DB9A7B8BFFA6FF29DC200?sequence=1. Access: set, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Report on diabetes** [Internet]. Geneva; 2016 Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf Access: nov, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. World Heal Organ [Internet]. p. 1–88, 2016. Available from: <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Access: set, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, p. 45, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization Report 2002: reducing risks, promoting healthy life**. Geneva: WHO, 2002.

WU, LY.; et al. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. **European Journal Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 116-24, 2004.

Yan X.T., Li W., Sun Y.N., Yang S.Y., Lee S.H., Chen J.B., Jang H.D., Kim Y.H. Identification and biological evaluation of flavonoids from the fruits of *Prunus mume*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**; v. 24; n. 5; p. 1397-1402, 2014

YANG G.M.; et al. Antitumor effects of two extracts from *Oxytropis falcata* on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. **Chinese Journal of Natural Medicines**; v. 11; n. 5; p. 519-524, 2013.

YUNG-SHARP, D.; KUMAR, R. Protocols for the visualisation of DNA in electrophoretic gels by a safe and inexpensive alternative to ethidium bromide. **Technique**, v.1, n3, p.183-187, 1989.

ZARLENGA, D. S.; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and Quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZDERO C.; et al. *ent*-Clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species. **Phytochemistry**, v. 28, p. 531–42, 1989.