

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

***Ação do extrato bruto da entrecasca da Vatairea macrocarpa sobre a secreção
e sinalização da insulina em tecidos envolvidos na homeostase glicêmica***

Paula Domingues Babiloni

Cuiabá – MT

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

Ação do extrato bruto da entrecasca da Vatairea macrocarpa sobre a secreção e sinalização da insulina em tecidos envolvidos na homeostase glicêmica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Nutrição.

Linha de Pesquisa: Metabolismo e Transdução de Sinais.

Orientanda: Paula Domingues Babiloni

Orientadora: Profa. Dra. Nair Honda Kawashita

Co-orientadora: Profa. Dra. Amanda Martins Baviera

Cuiabá – MT

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte

B354a Baveloni, Paula Domingues.

Ação do extrato da entrecasca da Vatairea macrocarpa sobre a secreção e sinalização da insulina em tecidos envolvidos na homeostase glicêmica / . – 2010.

xi, 82 f. ; il. ; 30 cm. -- (inclui figuras).

Orientadora: Nair Honda Kawashita.

Co-orientadora: Amanda Martins Baviera.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2010.

1. Diabetes. 2. Insulina. 3. Vatairea macrocarpa. 4. Antioxidante I. Título.

CDU 615.32

“Algumas pessoas sonham com o sucesso, outras levantam cedo e batalham para alcançá-lo”

(Aleksander Mandic)

DEDICATÓRIA

*À minha querida família,
Pelo amor, incentivo e aceitação incondicional da minha dedicação à pesquisa
científica.*

AGRADECIMENTOS

- A **DEUS** pelo seu infinito amor e bondade em nos conceder o dom da sabedoria.
- A Profa. **Dra. Nair Honda Kawashita**, pela sua exigente orientação que me torna cada dia mais precisa em tudo o que faço. Obrigada por ter me aceitado em seu laboratório, me apresentado um novo mundo de expectativas e por ter entrado na minha vida. Pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, por ter acreditado em mim e sempre me incentivado.
- A Profa. **Dra. Amanda Martins Baviera**, minha co-orientadora por me preparar tão bem e me ensinar a domar a eletroforese. Obrigada pela sua simplicidade e incentivo desde o início da minha trajetória.
- A toda minha família, pelo carinho e apoio durante todo o tempo. Em especial ao meu pai **Fernando Maurício Babiloni** pelo amor e cuidado em todos os momentos da minha vida, pelo incentivo acima de tudo.
- Em especial, a minha grande amiga **Maísa Pavani dos Santos**, obrigada pelo carinho, confiança, amizade, companheirismo nos dias felizes e tristes. Pelas nossas aventuras e paciência em me ensinar a cuidar dos ratinhos, pela ajuda nos experimentos. Você sabe quanto foi importante nessa etapa da minha vida! Obrigada.
- Aos meus amigos **Gustavo e Damiana** pela disposição e ajuda nos experimentos aos finais de semanas e feriados. Vocês foram essenciais, por tornar os vários dias de experimentos mais divertidos e menos cansativos para mim. Vocês são ótimos, sabem que podem contar comigo.

- A minha amiga **Mayara Perón Pereira**, obrigada pela valiosa cooperação, pelo convívio e pela disposição. Te admiro muito.
- A Dra **Isis do Carmo Kettelhut** e ao Dr. **Luiz Carlos Carvalho Navegantes** por abrirem as portas do Laboratório de Controle do Metabolismo, da USP-Ribeirão Preto para meu crescimento experimental.
- Ao Prof. Dr. **Edson Molleta** pelo auxílio na análise histológica.
- Ao pessoal de Ribeirão Preto: **Maria Antonieta, Neuza, Elza, Danúbia, Edu, Dawid, “Fernandinho”, Sílvia, Flávia e Lidiane** pelo auxílio, competência e pela paciência em ensinar detalhes das práticas.
- Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências, obrigada pelos ensinamentos.
- Ao **Msc.Helder Cássio de Oliveira**, pela amizade e acima de tudo por dar os primeiros passos nos estudos sobre a *Vatairea macrocarpa*.
- Ao **Air Francisco**, pelo auxílio, amizade, harmonia e momentos de descontração.
- Ao **Celso Afonso**, pela paciência e disponibilidade em todos os momentos.
- A **Marlene Mariano** pelo carinho, apoio, amizade e colaboração.
- Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica: **Carolinny Torres, João Carlos, Andressa Viegas, Carlos Dechandt, Patrícia Ceolin, Daniel Feres, Esther Narciso, Rapher Santos**, obrigada pela amizade, paciência e agradável convívio todos os dias.
- A minha amiga de mestrado **Samyra Lopes Buzelle**, valeu pelas informações e sugestões, pelos momentos de diversão e companheirismo na maravilhosa viagem a Ribeirão Preto. Obrigada!

- A minha amiga **Andreza Lúcia Menezes**, exemplo de mãe, humor exemplar, batalhadora e acima de tudo muito competente. Sentirei sua falta...
- A **Silvia Regina**, meus agradecimentos pelas informações sobre a via de sinalização da insulina.
- A todos os funcionários do Biotério em especial ao “**Jorginho e Chiquinho**” por sempre atenderem prontamente meus pedidos e pelos cuidados com nossos queridos ratinhos.
- A Secretaria Estadual de Saúde (**SES-MT**) e ao diretor do Hospital Regional Dr. Antônio Fontes (**HRAF**), pela compreensão e apoio nesta jornada, meu muito obrigado.
- As minhas amigas farmacêuticas **Janete Perin Turazzi e Maria Emília Janela Alves**, obrigada pelo incentivo e motivação para que eu alcançasse esse objetivo. Amo vocês.
- A todos meus amigos da 1º turma do Mestrado em Biociências pelo valioso convívio; em especial ao **Leonardo Marin, Simone Lemes e Letícia Ignácio de Souza**, pelo carinho e admiração eterna.
- **A todos** que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase B
ATP	Adenosina trifosfato
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
DC	Diabético controle
DM	Diabetes mellitus
DT	Diabético tratado
EBEtOH	Extrato bruto etanólico
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GLUT2	Transportador de glicose tipo 2
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
HO ⁻	Hidroxila
HO ₂	Hidroperoxila
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
IRS-1	Primeiro substrato do receptor de insulina
IRS-2	Segundo substrato do receptor de insulina
LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
LHS	Lipase hormônio sensível
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MDA	Malonaldeído
NADH	Nicotinamida adenina di-nucleotídeo reduzido

NADPH	Nicotinamida adenina di-nucleotídeo fosfato
	Reduzido
NOS	Sintetase de Óxido Nítrico
O_2^-	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 quinase
PKA	Proteína quinase A
PKB	Proteína quinase B
STZ	Estreptozotocina
TAG	Triacilglicerol
Tyr	Tirosina
v.o	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1. Vias de sinalização da insulina	21
--	----

Figura 2: Vatairea macrocarpa e sua entrecasca	35
---	----

Artigo 1

Figure. 1. Immunohistochemiscal study of non-diabetic (NC) (1A), diabetic control (DC) (1B) and diabetic treated (DT) (1C) rats of 500 mg/kg of <i>V. macrocarpa</i> extract. The1A, 1B and 1C figure showed the pancreatic islets of the β -cells immunocoread for insulin	56
--	----

Figure 2. Total insulin content of pancreas from non-diabetic (NC), diabetic control (DC) and diabetic treated with 500 mg/kg of <i>V. macrocarpa</i> extract rats. The total insulin content of pancreas was determinate after 21 days treatment with extract	56
---	----

Figure 3. Insulin release by islets from non-diabetic rats in response stimuli with 2.8 mmol (3A), 8.3 mmol (3B) and 16.8 mmol (3C) of glucose. The islet were incubated in absence (0.0 mg/mL) or presence of differents concentrations (0.01, 0.1, 1 and 5 mg/mL) of extract of <i>V. macrocarpa</i>	57
---	----

Artigo 2

Figure 1. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in liver from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and liver fragments were obtained after 30-s 78

Figure 2. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in RWAT from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and RWAT fragments were obtained after 120-s 79

Figure 3. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in EDL muscles from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and EDL fragments were obtained after 90-s 80

Figure 4. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on PEPCK protein levels in liver from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-PEPCK 81

Figure 5. In vitro antioxidant effect of *V. macrocarpa* stem bark extract against DPPH scavenging capacity. Ascorbic acid was used as control 82

Figure 6. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on MDA levels in plasma (6A) and liver (6B) from diabetic rats 82

RESUMO

Estudo em nosso laboratório conduzido por Oliveira et al (2008) constataram atividade antidiabética do extrato bruto etanólico (EBEtOH) da *Vatairea macrocarpa* na dose diária de 500mg/Kg (v.o) por 21 dias, em ratos diabéticos, com redução da glicemia pós-prandial, glicosúria, uréia urinária e a melhora de vários outros parâmetros alterados no Diabetes. Diante desta constatação, o objetivo deste trabalho foi investigar o(s) possível(is) mecanismo(s) da ação antidiabética do extrato. A possível ação benéfica do extrato sobre o pâncreas foi investigada através da dosagem de conteúdo de insulina pancreática e detecção de células β insulino-reativas por imunohistoquímica do pâncreas de animais diabéticos (STZ), tratados (500mg/Kg, v.o por 21 dias) e não tratados com o extrato. Com o mesmo objetivo foram realizados experimentos, onde a secreção de insulina por ilhotas de animais não diabéticos foi avaliada na presença de várias concentrações de glicose (2,8; 8,3 e 16,8 mmol) e extrato (0,0; 0,01; 0,1; 1 e 5 mg/mL). A investigação sobre um possível efeito do extrato a nível periférico foi realizada através da determinação do conteúdo de proteínas IR, AKT e p-AKT, da via de sinalização de insulina (músculo, tecido adiposo e fígado) por Western-blot. Por este mesmo método foi avaliado o conteúdo da PEPCK (enzima chave da neoglicogênese) no fígado. Tendo em vista, a relação direta do Diabetes com o estresse oxidativo, foi avaliada a lipoperoxidação, pela concentração de malonaldeído (MDA) hepático e sanguíneo. Todos os experimentos acima foram realizados em animais diabéticos tratados (DT) e diabéticos controles (DC). As análises estatísticas foram realizadas por Teste t-Student ou Anova duas vias. A imunohistoquímica mostrou que houve um pequeno aumento no número de células β insulino-reativas no pâncreas de animais tratados, que parece não ter se traduzido em grandes benefícios à função pancreática, uma vez que não houve aumento no conteúdo de insulina no pâncreas destes animais. Os resultados de secreção estática de insulina mostraram aumento da secreção somente na concentração basal de glicose (2,8 mM) e na presença de 0,1 e 0,01 mL de extrato. Estes resultados parecem indicar que o extrato poderia apresentar algum benefício na secreção, mas não na síntese de insulina. Os animais DT tiveram aumento no conteúdo de IR no fígado, músculo e tecido adiposo e aumento na fosforilação basal (em todos os tecidos) e na fosforilação estimulada por insulina apenas no fígado. A expressão do conteúdo da PEPCK diminuiu com o tratamento, assim como os níveis de malonaldeído plasmático e hepático. Podemos concluir que o extrato não levou a alterações significativas na função pancreática que justifique as ações antidiabéticas do extrato, sendo o efeito antidiabético, resultado de uma ação a nível periférico com melhora na sinalização da insulina e uma provável redução da produção de glicose pelo fígado (redução da PEPCK). O extrato parece apresentar significativa atividade antioxidante que pode estar contribuindo para os efeitos antidiabéticos do extrato bruto da *V. macrocarpa*.

Palavras chaves: diabetes, insulina, *Vatairea macrocarpa*, antioxidante.

ABSTRACT

In our laboratory previous studies from Oliveira et al. (2008) confirmed the antidiabetic activity of the stem bark extract (ethanol 70%) of *Vatairea macrocarpa* at a dose of 500 mg/kg, by 21 days, in diabetic rats with reduction of the serum and urinary glucose, urinary urea and improvement of the other parameters altered by diabetes. In front this evidence the aim of this study was to evaluate the possibilities mechanisms of extract antidiabetic action. The possible beneficial action of extract about the pancreas was evaluated through pancreatic insulin content determination and detection of reactive-insulin cells by pancreatic immunohistochemistry by diabetics animals (streptozotocin), treated (500 mg/kg, oral vial, by 21 days) and non-treated with of extract. At the same aim were made experiments where the islets insulin secretion of non-diabetics rats was evaluated in the presence of various glucose concentration (2.8, 8.3 and 16.8 mmol) and extract (0.0, 0.01, 0.1, 1 and 5 mg/mL). The possible peripheral effect by extract was evaluated through the protein content (IR, AKT e p-AKT) of insulin signaling pathway (muscle, white adipose tissue and liver) by western blotting. The same method was utilized to evaluate the PEPCK content (key enzyme of gluconeogenesis process) in liver. In view of direct relation of the oxidative stress and Diabetes was evaluated the lipoperoxidation by malondialdehyde hepatic and seric concentration (MDA). All the experiments above were realized in diabetics treated (DT) and control diabetic animals (DC) (Student's test). The immunohistochemistry showed an increase in numbers of β reactive-insulin cells of the pancreas of the treated animals, which it seems not to have if translated in benefices greats of pancreatic function, one time that did not to have increase in pancreas insulin content of theses animals. The results from static insulin secretion showed an increase of the secretion only in basal glucose concentration (2.8 mM) and in the presence of the 0.1 and 0.01 mL of extract. Theses results seem to indicate that extract it could to show some benefit in secretion but no in insulin synthesis. The antidiabetic effect of extract seems to depend more a periphery action, one time that DT animals had an increase in IR content in liver, muscle and adipose tissue. The PEPCK content decrease with treatment, such as the seric and hepatic MDA levels. Thus we con to conclude with extract no provoke significant alterations in pancreatic function that can to justify the antidiabetic actions observed. Nevertheless, we can to note important alterations the peripheral levels with an improvement in insulin signaling and probably a reduction in gluconeogenesis (PEPCK reduction) decreasing the glucose generation by liver. The extract seems to show a significant antioxidant activity that can to be contributing to the antidiabetic effects of stem-bark of *V. macrocarpa* extract.

Keywords: Diabetes, insulin, *Vatairea macrocarpa*, action mechanism

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1. <i>Diabetes Mellitus</i>	16
1.2. Plantas Medicinais	24
1.3. Plantas Antidiabéticas	27
1.4. Estresse oxidativo no diabetes e plantas com atividade antioxidante	30
1.5 <i>Vatairea macrocarpa</i>	33
1.6 Referências bibliográficas	36
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. ARTIGO 1	44
4. ARTIGO 2	58

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Diabetes mellitus

As células do organismo necessitam continuamente de energia para se manterem vivas e para realizarem inúmeras reações intra e extracelulares. O ciclo metabólico se inicia com a ingestão e absorção dos nutrientes da dieta e o excesso de ingestão calórica, proveniente da alimentação, é armazenado nos “reservatórios” corporais, como: o fígado, tecido adiposo e músculo (Pamela, 2009).

No tecido hepático, o excedente de glicose da dieta é armazenado sob a forma de glicogênio ou convertido em ácidos graxos de triacilglicerol (AG-TAG) que serão transportados para os tecidos adiposos onde serão armazenados. A captação da glicose sanguínea para o meio intracelular ocorre por difusão facilitada, que é estimulada após a ligação da insulina ao seu receptor (receptor de insulina – IR) localizado na membrana plasmática das células-alvo.

Durante o jejum o glicogênio é degradado, liberando moléculas de glicose para a circulação, as quais serão utilizadas por outras células para produção de energia. Nesta mesma situação, o metabolismo energético do organismo é mantido ainda, a partir da hidrólise dos triglicerídeos (TAGs), armazenados no tecido adiposo, disponibilizando ácidos graxos e glicerol para serem utilizados como combustível pelos tecidos periféricos. Este processo de hidrólise dos TAGs, conhecido como lipólise, ocorre por ação da enzima lipase hormônio sensível (LHS), que é ativada a partir do neurotransmissor noradrenalina e por estímulo hormonal da adrenalina, do glucagon, dos glicocorticóides, do hormônio adrenocorticotrófico, dentre outros (Fonseca-Alaniz et al.,2006).

As catecolaminas e o glucagon são indutores do aumento intracelular do segundo mensageiro, conhecido como Adenosina Monofosfato Cíclico (AMP_c) por

ativação da adenilato ciclase que converte o ATP em AMP_c. O AMP_c ativa a proteína quinase A (PKA), que irá ativar a LHS enzima responsável pela hidrólise dos TAGs, por fosforilação. A PKA também atua sobre as perilipinas de forma semelhante à LHS. Ao serem fosforiladas, as perilipinas se deslocam da superfície das gotículas de gordura e se dispersam pelo citossol abrindo espaços para o acesso da LHS ativar o seu substrato, o TAG. A insulina, por favorecer o processo de defosforilação da LHS e das perilipinas, seja ativando as fosfatases ou favorecendo a hidrólise do AMP_c, tem uma ação anti-lipolítica sobre os TAGs (Jaworski et al. 2007).

Os ácidos graxos resultantes da hidrólise são transportados para os tecidos periféricos ligados à albumina, e podem ser utilizados como fonte de energia pela formação de unidades de acetil coA que poderão ser degradados pelo Ciclo de Krebs (Fonseca-Alaniz et al.,2006).

A maior parte do glicerol liberado na circulação é fosforilado a glicerol 3 fosfato, principalmente no fígado, que se isomeriza a diidroxiacetona fosfato, podendo ser degradado pela via glicolítica a piruvato ou formar glicose através da neoglicogênese. A insulina é um regulador importante inibindo a neoglicogênese e ativando a via glicolítica.

Alterações nestes processos, desde a diminuição na captação de glicose pelos tecidos periféricos, ao armazenamento e a mobilização destes combustíveis são observados no Diabetes.

O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizado pelo aumento da glicemia (hiperglicemia), decorrente da falta de insulina e/ou incapacidade desta em exercer adequadamente seus efeitos nos tecidos-alvos (Babu, 2009).

Cronicamente está associado à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2010). O paciente diabético apresenta sintomas característicos tais como: polidipsia, poliúria, polifagia, visão turva, perda de peso e, em casos mais graves, pode desenvolver cetoacidose ou um estado hiperosmolar não cetônico que pode conduzir à letargia e coma, e na ausência de tratamento adequado, à morte.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Associação Americana de Diabetes (ADA) propuseram incluir quatro classes clínicas na classificação do Diabetes: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos (secundário a doença pancreática, resistência congênita ou adquirida à insulina, relacionados a anormalidades da insulina, associado à desnutrição ou fibrocalculoso e tipo LADA – Latent Autoimmune Diabetes in Adults) e diabetes mellitus gestacional (Diretrizes Brasileiras de Diabetes, 2006).

O DM tipo 1 é o resultado de uma destruição das células β -pancreáticas com conseqüente deficiência de insulina. Na maioria dos casos, esta destruição é ocasionada por auto-imunidade; porém existem casos que não apresentam estas evidências, sendo caracterizada como forma idiopática do DM tipo 1. Pessoas com diabetes do tipo 1 constituem aproximadamente 5 a 10% dos casos existentes (Pamela, 2009). O DM tipo 2 caracteriza-se por defeitos na ação e na secreção da insulina. Em geral, ambos os defeitos estão presentes quando a hiperglicemia se manifesta, porém pode haver predomínio de um deles. É a forma mais comum da doença atingindo cerca de 90 a 95% dos casos (Diretrizes Brasileiras de Diabetes, 2006; Pamela, 2009; Neto et al., 2009).

Independente da classificação, a doença é considerada como uma das principais ameaças à saúde humana do século XXI. Mudanças no ambiente, comportamento e estilo de vida dos seres humanos, que acompanham a globalização têm resultado em obesidade e diabetes. Segundo Shaw et al. (2010), a população de diabeticos no mundo é 285 milhões, com estimativa que este número aumente para 439 milhões, em 2030.

A insulina, hormônio relacionado diretamente ao Diabetes mellitus é o principal hormônio anabólico que regula o metabolismo intermediário. Além de participar de processos de crescimento e diferenciação celular, regula o metabolismo de proteínas, lipídios e glicose (Carvalho et al., 2002; Yeo e Sawadon, 2007). A secreção de insulina pelas células β pancreáticas é modulada por nutrientes, neurotransmissores e hormônios. No período pós-prandial há um aumento na secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas em resposta, principalmente, a elevados níveis séricos de glicose e aminoácidos.

A glicose é um importante estimulador fisiológico da secreção de insulina e é transportada para o interior da célula β por difusão facilitada através de uma proteína integral de membrana conhecida como GLUT2, onde é fosforilada pela glicoquinase e metabolizada, resultando no aumento da concentração intracelular de ATP (aumento da relação ATP/ADP) (Heber et al., 2001). Esse aumento bloqueia os canais de K^+ ATP – dependentes, levando a despolarização da membrana das células β e conseqüentemente a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, com o aumento no influxo deste íon para o citosol da célula. O aumento na concentração Ca^{2+} no meio intracelular promove a fusão das vesículas de insulina com a membrana plasmática da célula β (Cook e Hales, 1984; Valdeolmitos et al. 1992, Somes et al. 1979, apud Latorraca et al, 1999).

Como descrito anteriormente, a ação da insulina, depende de uma cascata de eventos (Figura 1), que se inicia pela ligação do hormônio ao seu receptor (IR), uma glicoproteína da família dos receptores do crescimento. Possui duas subunidades α (extracelular) ligadas por pontes dissulfeto e duas subunidades β (transmembrana), que possui uma atividade intrínseca de tirosina-quinase. A ligação da insulina à subunidade α estimula a atividade enzimática de uma das subunidades β e promove a fosforilação de vários resíduos de tirosina (Tyr) nesta sub-unidade. Esta autofosforilação ativa o receptor, o qual pode, então, fosforilar substratos intracelulares específicos. O IR pode ser considerado como uma enzima tirosina quinase controlada/estimulada pela insulina. Sua atividade quinásica é fundamental para todos os efeitos insulínicos, os quais não ocorrem quando a ausência de autofosforilação torna o receptor biologicamente inativo (Saad et al., 2002; Zierath e Karisson; 2007). A partir do receptor de membrana ativado, o sinal insulínico se propaga para o citoplasma através da ação do IR sobre seus substratos intracelulares, denominados de substratos do receptor de insulina (IRSs). Para a interação do IR com seus substratos citoplasmáticos, o domínio PTB (“phosphotyrosine binding”) do substrato reconhece as fosfotirosinas do receptor, quando estas estão na seqüência de aminoácidos NPXpY, ou seja asparagina – prolina – qualquer aminoácido – fosfotirosina. Desta interação transitória resulta a fosforilação do substrato pelo receptor tirosina quinase. Os substratos do IR são considerados moléculas acopladoras, por estarem em posição intermediária entre o IR e outras proteínas citoplasmáticas portadoras de domínios SH2 (src homology 2), que são importantes na propagação do sinal. Em outras palavras, durante sua interação com o IR, os IRSs são fosforilados em vários resíduos de tirosina, o que cria sítios de ligação para várias proteínas portadoras do domínio SH2. Atualmente

dez substratos do receptor de insulina já foram identificados. Mas somente quatro pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS. Os considerados mais específicos da via insulínica são o IRS1 e IRS2, que fosforilados em tirosina se ligam e ativam proteínas como a PI3-quinase (fosfatidil - inositol 3-quinase) e a MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno). As ativações destas proteínas desencadeiam a ativação de duas serinas-quinases: a AKT (também chamada de PKB) e as ERKs (quinases reguladas por sinal extracelular) (Lemos, 2006). Há evidências de que as diferentes isoformas de IRSs apresentam especificidade para diferentes tecidos. Os estudos indicaram que as isoformas 3 e 4 têm papel menor na sinalização insulínica.

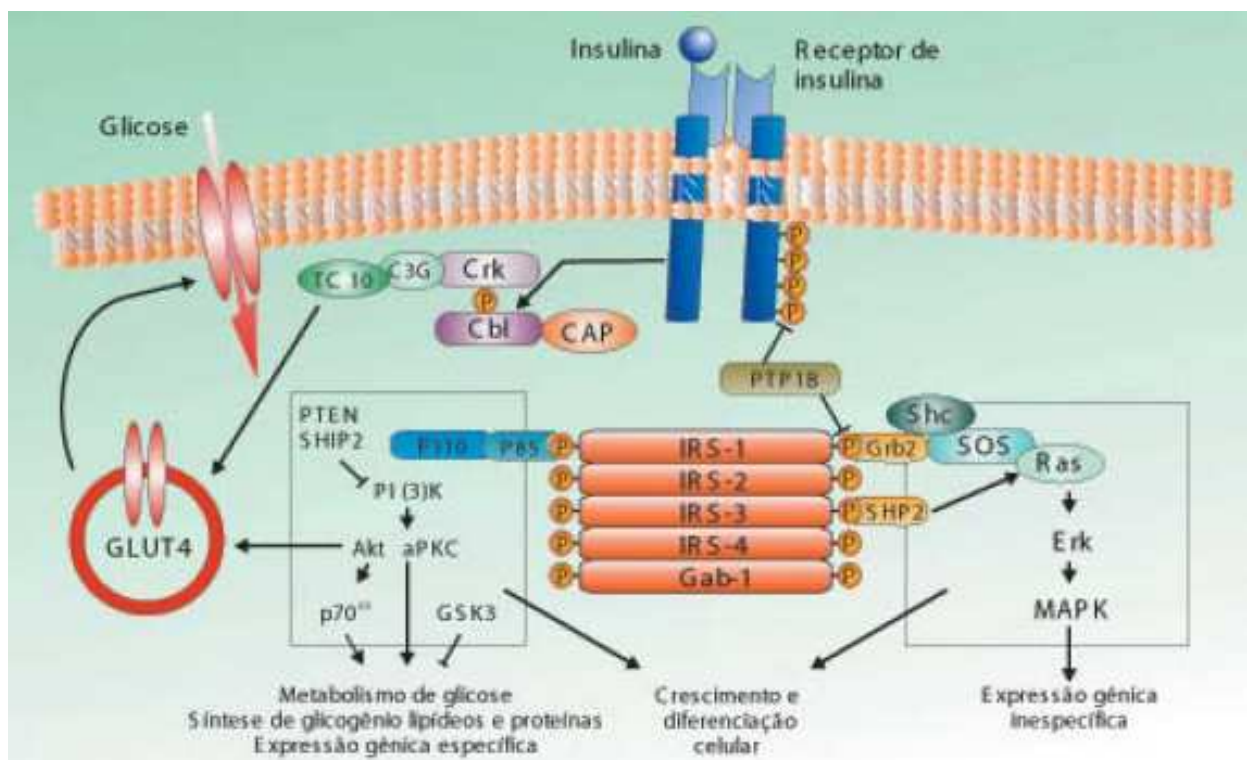


Figura 1: Via de sinalização da insulina

Dentre as ações e funções insulínicas, destaca-se o controle de importantes reações de síntese e degradação nos tecidos periféricos. Os efeitos glicorregulatórios da insulina dependem de sua ação principalmente no fígado, tecido adiposo e músculo, desencadeando uma cascata de reações moleculares, interagindo com um controle hipotalâmico, que leva a uma série de ações biológicas.

No fígado, a insulina promove a oxidação da glicose e o seu armazenamento como glicogênio e inibe a gliconeogênese e glicogenólise, o que reduz a produção hepática de glicose (Lemos, 2006); estimula ainda, a síntese hepática de lipídios.

Na célula muscular e no adipócito, a insulina é importante para promover a captação de glicose, sua utilização como fonte energética, bem como a estocagem do excedente, quer na forma de glicogênio, quer na forma de gordura. A captação de glicose nestes tecidos depende da translocação do transportador de glicose GLUT4 para a superfície da célula que é estimulada pela insulina. A insulina, responsável ainda, por reduzir a liberação de ácidos graxos no tecido adiposo inibindo a lipólise e estimulando a lipogênese. Os efeitos anabólicos da insulina ocorrem também sobre o metabolismo das proteínas, aumentando a síntese protéica.

Desta forma, em situações onde a ação da insulina está prejudicada, como no Diabetes, a hiperglicemia, característica da doença, é decorrente do prejuízo na captação da glicose e na sua utilização, associado a um aumento na produção hepática através do aumento da neoglicogênese. No Diabetes, a intensa proteólise e lipólise são resultantes da ausência do estímulo anabólico da insulina, com grande perda de massa muscular e redução nos depósitos de gordura.

Os grandes prejuízos causados pelo Diabetes, aguda e cronicamente, podendo levar inclusive a morte são decorrentes principalmente da hiperglicemia. A

convivência com a doença exige um controle rigoroso dos níveis de glicose sanguínea, uma vez que ainda não existe cura para a mesma. Intervenções medicamentosas com esta finalidade mostram efeitos positivos, mas com custo elevado e efeitos colaterais.

A melhora no controle do diabetes pode ser alcançada através do tratamento não-medicamentoso e medicamentoso, proporcionando ao paciente uma melhor condição de vida associada à prevenção das complicações agudas e crônicas. (Nery et al., 2008). O tratamento não-medicamentoso tem como finalidade primária retardar a implantação da doença, e quando já estabelecida evitar o uso de medicamentos. Modificações no estilo de vida, educação dos pacientes, prática de atividade física, mudanças de hábitos alimentares, redução de peso e abandono de alguns vícios prejudiciais à saúde, como o tabagismo e o alcoolismo, são importantes no controle do diabetes (Kuriyan et al., 2008). O tratamento medicamentoso tem por objetivo alcançar o controle glicêmico satisfatório em pacientes que não conseguiram melhora através de medidas não-medicamentosa. Esse tratamento apresenta duas modalidades diferentes: a terapia com hipoglicemiantes orais e a insulino terapia (Santos et al., 2009). Entre os hipoglicemiantes orais destacam-se os que estimulam a secreção de insulina, conhecidos como secretagogos da insulina, como as sulfoniluréias e as glinidas; aqueles que melhoram a sensibilidade insulínica nos tecidos periféricos, como a metformina e a pioglitazona; e os que reduzem a absorção de glicose a nível intestinal, como a acarbose. A insulino terapia é à base do tratamento para todos os pacientes diabéticos do tipo 1, enquanto que em pacientes diabéticos do tipo 2 o tratamento pode ser realizado associando o uso dos hipoglicemiantes orais com a administração de insulina.

A manutenção do controle glicêmico é fundamental para prevenir complicações micro e macrovasculares. No entanto, independente do tipo de tratamento, ocorre uma piora progressiva da função das células β pancreáticas, sendo que após 9 anos de terapia, 75% dos pacientes necessitam associação de múltiplos recursos para manter o controle glicêmico. Este quadro progressivo é uma evolução natural da enfermidade, entretanto, pode ser acelerado quando a prescrição não é cumprida adequadamente, pois a adesão ao tratamento é em média 50% (Duarte et al., 2009). Nos últimos tempos, muitos tipos de terapias, baseadas na utilização de células-tronco, vêm sendo propostas para o tratamento de várias doenças degenerativas. Uma delas é a aplicação de células- tronco para a reposição de ilhotas não funcionais no órgão nativo, ou seja, o uso de células-tronco como uma fonte inesgotável de células β para transplante (Lojudice, 2008). Por outro lado, apesar da disponibilidade de todo esse arsenal terapêutico, em geral, apresentando altos custos ao paciente, a dificuldade ao acesso de tratamentos médicos e a vasta tradição da população no uso de plantas medicinais, tem se recorrido a terapias alternativas para o controle da hiperglicemia (Rates, 2001; Sousa, et al. 2009)

1.2. Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais como fonte de alívio e cura para diversas patologias remonta às antigas civilizações (Silveira e Olea, 2009). Existem relatos do uso de plantas com finalidades terapêuticas a 3.000 a.C, como a obra Pen T'ao do imperador chinês Shen Nung. Os documentos mais antigos mostram que a fitoterapia era associada à magia e considerada como “um presente dos deuses”,

que permitia aos seres humanos vencerem os poderes maléficos da terra. (Newman e Cragg, 2009).

Foi por meio da observação e da experimentação, que as propriedades terapêuticas das plantas foram sendo descobertas e propagadas, fazendo parte da cultura popular (Turolla e Nascimento, 2006).

O desenvolvimento tecnológico do século XIX marcou o início de um novo capítulo dentro da fitoterapia, direcionando as pesquisas no sentido de isolar os princípios ativos de plantas. O isolamento da morfina a partir da *Papaver somniferum* em 1803, pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürmer é um marco dentro desta nova etapa. Posteriormente, outras substâncias como a quinina e a quinidina foram isoladas da *Cinchona SP* (1819) e a atropina da *Atropa belladonna* (1831), passando a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (De La Cruz, 2008; Newman e Cragg, 2009).

No século XXI, os avanços científicos na área da química farmacêutica possibilitaram a síntese de numerosas substâncias biologicamente ativas e também a sua produção em larga escala, reduzindo o custo e aumentando o arsenal terapêutico para inúmeras doenças.

No entanto, apesar do grande número de medicamentos existentes no mercado e dos grandes avanços no campo da medicina, grande parcela da população não aboliu o uso de produtos ditos naturais (oriundos da flora e fauna), não só pela convicção da importância das plantas para a manutenção da saúde, mas segundo a Organização Mundial da Saúde, também por fatores econômicos (Silveira e Olea 2009). Calixto (2000) afirma que cerca de 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam as plantas medicinais para os cuidados

primários com a saúde pela falta de recursos econômicos para a aquisição de medicamentos.

No Brasil, apesar deste alto índice de consumo de plantas medicinais da flora nativa, da mesma forma que ocorre mundialmente, existem poucos estudos sobre as propriedades farmacológicas destas plantas. O uso tradicional baseado em conhecimentos populares, aliado ao falso conceito tão prevalente entre a população leiga, de que “por ser natural não provoca reações adversas”, tem contribuído para o reduzido número de estudos pré-clínicos e clínicos, com a finalidade de comprovar não só sua eficácia, mas também a sua toxicidade (Turolla e Nascimento, 2006). Comparada aos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade das plantas medicinais e dos fitoterápicos pode parecer pouco relevante, entretanto, trata-se de um sério problema de saúde pública, pois dependendo do princípio ativo e da sua concentração, o uso da mesma pode ser letal. Além dos efeitos adversos, possíveis adulterações, bem como complicações resultantes da ação sinérgica entre os componentes de outras plantas ou de medicamentos sintéticos, ocorrem freqüentemente (Veiga Junior et al., 2005).

Estudos realizados por Tresvenzol et al. (2006) apontam para um outro problema comum no emprego da fitoterapia: “A correta identificação da planta”. Segundo o autor, algumas plantas medicinais comercializadas por raizeiros, entre elas, o chapéu de couro (*Echinodorus sp.*), a pata-de-vaca (*Bauhinia sp.*) e a assa-peixe (*Vernonia sp.*), são comumente identificadas apenas quanto ao gênero, e as diferentes espécies são utilizadas, como apresentando as mesmas propriedades terapêuticas. Estes fatos evidenciam a necessidade das autoridades sanitárias regulamentarem o comércio de plantas, reforçando o cuidado quanto à identificação

botânica da espécie comercializada; etapa fundamental no sucesso do tratamento com plantas medicinais.

A seleção das espécies vegetais para a investigação do seu potencial farmacológico é extremamente complexo, levando-se em conta a imensa quantidade de espécies a explorar. Os relatos da medicina popular costumam ser vistos como a forma mais eficaz na seleção das espécies vegetais potencialmente terapêuticas (Auricchio, 2003).

No Brasil, a venda de medicamentos fitoterápicos cresce 15% ao ano, enquanto o mercado de medicamentos sintéticos cresce de 3 a 4 % (Febrafarma, 2007). Dentre 1100 espécies vegetais da flora brasileira avaliadas em suas propriedades medicinais, 590 plantas foram registradas no Ministério da Saúde para comercialização (Guerra e Nodori, 2003), sendo que boa parte delas possui patente estrangeira, sendo exploradas por multinacionais (Capistrano, 2002).

Estes relatos mostram a importância da pesquisa na comprovação da atividade farmacológica das plantas medicinais e seus efeitos colaterais, como o primeiro passo para a descoberta de novos princípios ativos e para a exploração sustentável da nossa biodiversidade trazendo divisas importantes para o país.

1.3. Plantas Antidiabéticas

Antes do advento da insulina exógena e dos hipoglicemiantes orais, o uso de plantas era a principal forma de controle do diabetes (Gray e Flatt, 1999). Atualmente, mesmo com a utilização de drogas hipoglicemiantes, os portadores do DM utilizam com grande frequência os tratamentos alternativos como as plantas medicinais, aplicando “o conhecimento acumulado na sua herança cultural familiar ou indicações de conhecidos” (Alves, 2007). Entre outros fatores já citados, as

complicações crônicas decorrentes do controle insatisfatório da glicemia são sem dúvida de extrema relevância para explicar não só a manutenção desta prática pela população, mas também a orientação da Organização Mundial de Saúde que referenda a pesquisa e a utilização de plantas medicinais para o tratamento do diabetes (Funari, 2005).

Os estudos etnofarmacológicos mostram que os princípios ativos presentes em plantas com atividade antidiabética estão relacionadas a diferentes classes de compostos químicos. Muitos hipoglicemiantes ativos são polissacarídeos, proteínas, esteróides, terpenóides, alcalóides, flavonóides, glicosídeos, triterpenos, óleos, vitaminas, saponinas, peptídeos e aminoácidos (Abdel -Hassan et al. 2000).

Tem sido constatado que as plantas antidiabéticas exercem seus efeitos por mecanismos bastante diversos, que vão desde a ação pancreática, estimulando a secreção de insulina e/ou prevenindo a restauração da integridade e função das células β até ações na sinalização insulínica nas células alvo; ou ainda, atuando a nível intestinal reduzindo a absorção de glicose ou diretamente em reações importantes na regulação da glicemia.

Maroo et al (2002) atribuíram o efeito hipoglicêmico da planta *Enicostemma littorale* Blume pelo estímulo do aumento da biossíntese de insulina pelas células β pancreáticas, propriedade semelhante as classes das sulfoniluréias (glibenclamida). Kasiviswanath et al. (2005); observaram a atividade hipoglicemiante e anti-hiperglicemiante da *Gmelina asiática* Linn., devido a sua inibição dos canais ATPase de K^+ nas células β pancreáticas aumentando a secreção de insulina. O extrato de *Panax ginseng* sp (Xie et al., 2005), *Eugenia jambolana* Lam. (Sharma et al., 2003), *Smallantus sonchifolius* Poepp (Aybar et al., 2001), *Cleomeo felina* L. (Nagarajan et al., 2005), *Scoparia dulcis* L. (Latha e Paris, 2004,) entre outros, melhoraram a ação

periférica da insulina diminuindo a concentração de glicose sanguínea. Os níveis séricos de glicose e os sintomas como polidipsia, polifagia e poliúria de ratos diabéticos induzidos com aloxano, foram significativamente reduzidos após o uso da *Inula japônica Regel* (Shan et al., 2006). Essa ação antihiperglicêmica do extrato é mais eficiente que o da droga metformina, uma biguanida, cujo efeito está relacionado ao aumento dos transportadores de glicose na membrana, inibição da gliconeogênese e ao aumento do metabolismo de glicose no fígado. Produtos isolados de plantas, como os flavonóides presentes em *Cephalotaxus sinensis*, facilitam a translocação de GLUT4 reduzindo significativamente a glicose sanguínea (Li et al., 2007). Os extratos de *Cleomeo felina L.* assim como a glibenclamida, aumentam a atividade das enzimas hexoquinase e lactato desidrogenase que são reduzidas pelo tratamento com aloxano na indução do diabetes (Nagarajan et al., 2005). Outra ação importante na redução da glicemia foi observada em extrato de *Tamarindus indica L.* onde o aumento do conteúdo de glicogênio muscular e hepático e a diminuição da atividade da glicose-6-fosfatase foram responsáveis por estes efeitos (Maiti et al., 2005).

Exemplos de plantas que apresentam efeito hipoglicêmico atuando a nível intestinal também são encontrados na literatura. O extrato de flores de *Cássia auriculata L.* e *Eugenia aperculata Roxb* apresentaram potente efeito antihiperglicêmico em ratos (Abensudara, 2004; Funke, 2006; Mai & Chuyen, 2007), pelo efeito inibitório da alfa-glicosidase, maltase e sucrase bloqueando a digestão do amido no intestino, retardando a absorção de carboidratos da dieta e a redução dos picos glicêmicos pós-prandiais.

Atualmente os estudos de plantas antidiabéticas têm envolvido também o estudo do potencial antioxidante, uma vez que tanto a gênese como as complicações do diabetes envolvem a formação de radicais livres.

1.4. Estresse oxidativo no diabetes e plantas com atividade antioxidante

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Como consequência de processos metabólicos aeróbicos, o organismo produz continuamente radicais livres conhecidos como espécies reativas do oxigênio (EROs), que são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros elétrons presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como redutores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons. As EROs são produzidas durante a redução do oxigênio (O_2) a água (H_2O) na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Durante esse processo são formados intermediários reativos como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila ($OH^\cdot$), hidroperoxila (HO_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além da produção dos EROS em processos normais do metabolismo celular, muitas outras condições podem aumentar a sua produção levando a um estresse oxidativo (Reis et.al 2008).

O estresse oxidativo caracteriza-se por um estado de desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante endógena. Como consequência há um maior acúmulo de EROs que causam danos à estrutura das biomoléculas de DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares. Estudos comprovam que o estresse oxidativo está relacionado com o envelhecimento, atividade física intensa, apoptose, e com o desenvolvimento de

doenças crônicas e degenerativas, como câncer, arteriosclerose e diabetes mellitus (Reis et.al 2008).

Além das complicações metabólicas clássicas do diabetes mellitus, a superprodução de EROs está envolvida na etiologia e patogênese do diabetes (Evans et al., 2002, Newsholme et al., 2007), levando ao desenvolvimento de complicações diabéticas.

A exposição prolongada à hiperglicemia provoca o estresse oxidativo, caracterizando o perfil de toxicidade da glicose. Evidências indicam que os pacientes diabéticos têm, níveis aumentados de marcadores de EROs induzidos por danos gerados durante o metabolismo celular e uma diminuição das defesas antioxidantes (Reis et al., 2008) . Desta maneira, diversos mecanismos podem explicar o desenvolvimento do estresse oxidativo no diabetes mellitus:

a) O aumento no metabolismo intracelular da glicose (em tecidos insulino dependentes), que promove superprodução de NADH que, em excesso, leva a um aumento na produção de superóxido, quando da oxidação do NADH na cadeia transportadora de elétrons; (Rocha et al., 2006; Kawashita & Baviera, 2010).

b) A geração irreversível de produtos finais de glicação, que ocorre após as ligações covalentes não enzimáticas da glicose com as proteínas e lipídeos, induzindo a produção de EROs (Rocha et al., 2006, Forgiarini et al., 2009).

c) Ativação da via do poliol que contribui para a geração de EROs por meio da diminuição da concentração de NADPH - reduzindo a regeneração da glutatona e atividade de síntese do NOS (sintetase de óxido nítrico) - e aumenta a disponibilidade de NADH (Jay et al. 2006; Robertson e Harmon, 2006; Forgiarini et al., 2009).

Outro fator que se apresenta elevado nos pacientes diabéticos são os ácidos graxos livres e a leptina que contribuem para o aumento da geração de EROs. Os radicais livres peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais hidroxilas (HO) também estão envolvidos na patogênese do diabetes (Oberley, 1988; Lenzen, 2008).

Esforços para promover a reversão do estresse oxidativo no diabetes mellitus representam uma possibilidade para a melhoria ou tratamento desta patologia. Os antioxidantes são substâncias que neutralizam ou previnem a oxidação de substratos oxidáveis. (Reis et al, 2008). Assim, além do seu efeito hipoglicemiante, o potencial antioxidante das preparações de plantas são agentes terapêuticos na prevenção e no tratamento das complicações do diabetes ligadas ao estresse oxidativo. Várias metodologias podem ser usadas para determinar os efeitos antioxidantes das plantas no diabetes experimental. O nível do estresse oxidativo animal pode ser determinado pela medição de analitos no plasma, tecidos e outros fluidos (Kawashita e Baviera, 2010). Dentre estes, vale a pena destacar um produto final da peroxidação lipídica, o malonaldeído, que é um dialdeído altamente reativo que eventualmente reage com grupos amino de proteínas, fosfolipídeos ou ácidos nucléicos, induzindo modificações estruturais nas moléculas biológicas (Batcioglu et al., 2009). O malonaldeído, bem como H_2O_2 e glutathiona reduzida, são analitos que podem ser medidos colorimetricamente a partir de amostras de tecido. As atividades das enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase, glutathiona peroxidase, são freqüentemente determinadas em amostras de plasma e tecidos de animais diabéticos tratados.

Diversos estudos farmacológicos têm demonstrado a atividade antioxidante de plantas em situação de diabetes experimental. Estudo de Sarkhail et al (2007) demonstrou que ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e tratados com o

extrato de partes aéreas de *Phlomis anisodonta* apresentaram resposta benéfica na doença, com redução da glicemia, aumento dos níveis de insulina e também redução do estresse oxidativo, através de ativação de enzimas antioxidantes hepáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), que levaram à redução da peroxidação dos lipídios hepáticos. Waisundara et al. (2008) Conseguiram resultados semelhantes em ratos diabéticos tratados com extrato de raiz de *Scutellaria baicalensis*, comumente prescritos na medicina com eficientes propriedades antioxidantes (Wang et al., 2007). Redução da hiperglicemia e do estresse oxidativo também foi observada em ratos diabéticos tratados com extrato de partes aéreas de *Matricaria chamomilla* L. (Cemek et al. 2008) e em ratos diabéticos obesos (ob-db) tratados com extrato de cacau, *Theobroma cacao* (Jalil et al., 2008). Segundo Yokozawa et al. (2009), ratos diabéticos induzidos com estreptozotocina e tratados com o extrato de *Kangen-karyu*, apresentaram efeitos favoráveis no diabetes, reduzindo os níveis de triglicerídeos e malonaldeído (MDA) hepático e sanguíneo. É importante salientar, portanto, que as substâncias naturais antioxidantes são agentes terapêuticos importantes na prevenção e no tratamento das complicações da diabetes.

1.5. *Vatairea macrocarpa*

A *Vatairea macrocarpa* (Benth.) Ducke é uma árvore nativa do cerrado brasileiro (figura 02). Possui madeira valiosa e é conhecida popularmente como amargoso, maleiteira e angelim-do-cerrado. O chá da *V. macrocarpa* é utilizado na medicina popular para tratar os sintomas de diabetes, bem como outras doenças (Guarim Neto e Moraes, 2003; Carvalho, 2004). A parte da planta utilizada para a preparação do chá é a entrecasca. Os efeitos benéficos à homeostase glicêmica de

outras espécies da família Leguminosae utilizadas popularmente como anti-diabéticos foram verificados (Silva et al., 2002; Fuentes et al., 2004; Ojewole e Adewonmi, 2004). Segundo Martinez (2004) e Alencar (2003) a lectina isolada das sementes da *V. macroparpa* apresentou efeito benéfico sobre os linfócitos e ação inibitória sobre a resposta inflamatória a diversos estímulos. A atividade antidiabética da *Vatairea macrocarpa* foi avaliada por Oliveira et al (2008), que mostraram que a administração do extrato bruto da *Vatairea macrocarpa* na dose de 500mg/Kg (v.o) à ratos diabéticos, durante 21 dias, levou a melhora de todos os parâmetros avaliados: redução da glicemia pós-prandial, ingestão de alimento e água, glicose e uréia urinária. Os animais tratados com o extrato apresentaram melhora no ganho de peso corporal, depósitos de glicogênio hepático e aumento nos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal. Entretanto, mais estudos são necessários para um melhor esclarecimento quanto aos mecanismos antidiabéticos da *V. macrocarpa*. Portanto nosso objetivo foi avaliar um possível mecanismo de ação antidiabética do extrato bruto etanólico (EBEtOH) da *Vatairea macrocarpa* no pâncreas e em tecidos periféricos.

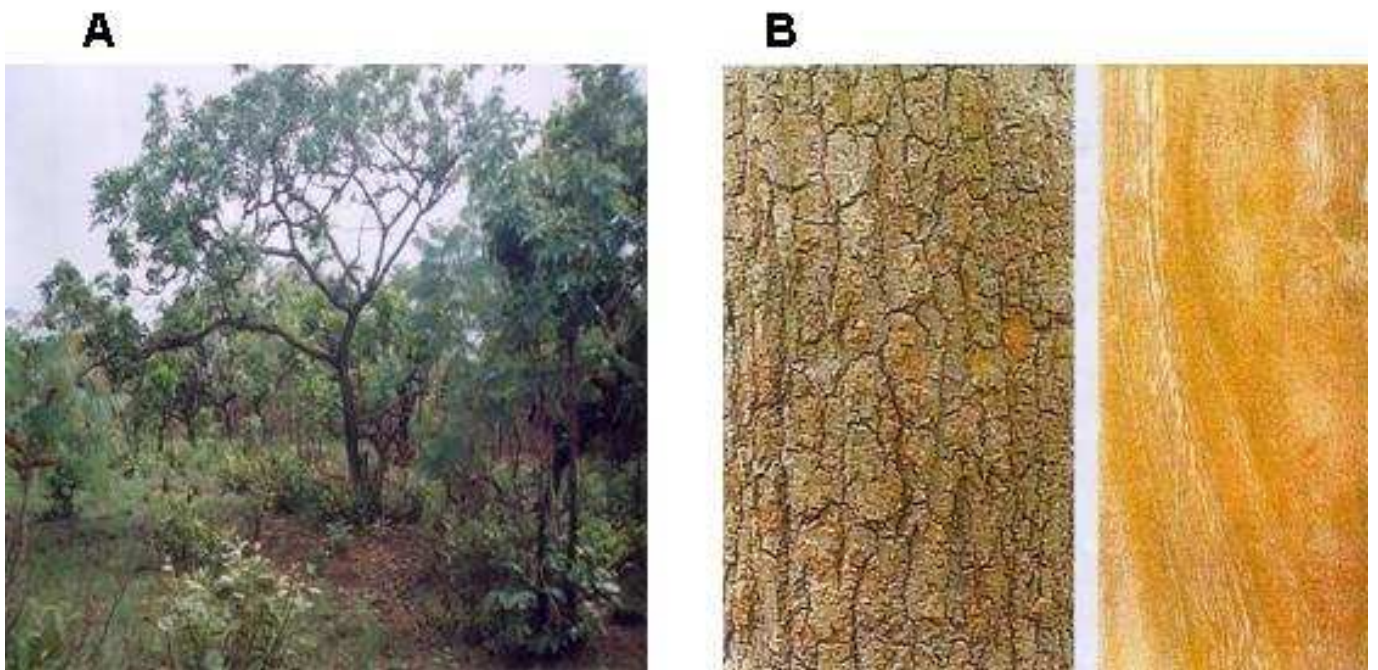


Figura 2: *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke (A) e sua entrecasca (B)

1.6. Referências Bibliográficas

Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A., Mohammeda, S.T., 2000. The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* 71, 325-330.

Abesundara, K.J.M., Matsuit, T., Matsumoto, K., 2004. α -Glicosidase inhibitory activity of some Sri Lanka plant extracts, one of which, *Cassia auriculata*, exerts a strong antihyperglycemic effect in rats comparable to the therapeutic drug acarbose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2541-2545.

Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Alencar, V.B.M., Melo, S.C., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., 2003. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 1674–1681.

Alves, R. R. N., Silva, A. A. G., Souto, W. M. S., Barboza, R. R. D., 2007. Utilização e comercio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. *Revista eletrônica de Farmácia* IV, 175-198.

American Diabetes Association (ADA)., 2006. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 29, S43-S48.

Auricchiol, M.T.; Bacchi, E.M., 2003. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitangueira): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 62, 55-61.

Aybar, M., Riera, A.N.S., Grau A, Sánchez S., 2001. Hypoglycemic effect of the water extract of *Smallantus sonchifolius* (yacon) leaves in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 125-132.

Babu, P.S., Ignacimuthu, S., Agastian, P., Varghese, B., 2009. Partial regeneration of β -cells in the islet of Langerhans by Nymhayol a sterol isolated from *Nymphaea stellata* Willd) flowers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 17, 2864-2870.

Batcioglu, C. O., Karaas, F., Hazneci, E., Genc, M., 2009. Comparison of plasma malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase, hydroxyproline and selenium levels in patients with vitiligo and healthy controls. *Indian J Dermatol* 53, 106-110.

Calixto, J.B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33, 179-189.

Carneiro, E. M., Latorraca, M. Q., Araujo, E., Beltrá, M., Oliveiras, M.J., Navarro, M., Berna, G., Bedoya, F.J., Velloso, L. A., Soria, B., Martín, F., 2009. Taurine

supplementation modulates glucose homeostasis and islet function. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 503-511.

Carvalho, J.B., Ribeiro, E.B., B. GR, Telles, M.M., Velloso, L.A., Gontijo, J.A., et al., 2003. Characterization of selective insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats'. *Diabetologia* 46,1629–1640.

Capistrano A.W., 2002. Uso de plantas medicinais nas comunidades do Rio Tavares, Lagoa da Conceição e Costeira do Pirajubaé. Trabalho de conclusão de curso, Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Medicina.

Cemek, M., Kađa, S., Simpek, N., Büyükokurođlu, M.E. and Konuk, M., 2008. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Matricaria chamomilla* L. in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nat. Med.* 62, 284–293.

De La Cruz, 2008. Plantas Medicinais de Mato Grosso: a farmacopéia popular dos raizeiros. Carlini & Caniato – Cuiabá, MT.

Dias, A.S., 2005. O Antioxidante Quercetina diminui o Estresse Oxidativo hepático em ratos diabéticos. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre p.111.

Dorigoni, P. A. et al., 2001. Levantamento de dados sobre plantas medicinais de uso popular no município de São João do Polêsine, RS, Brasil. Relação entre enfermidades e espécies utilizadas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 4, 69-79.

Dorna, W.C., Oliveira, T.T., Dore, R.G.R., Fabres, M.H.A., Nagem, T.J., 2008. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais 19, 488-500.

Dourado, E. R.; Doca, K. N. P.; Araújo, T. C. C. 2005. Comercialização de plantas medicinais por “raizeiros” na cidade de Anápolis-GO. *Revista Eletrônica de Farmácia. Suplemento* 2, 67-69.

Duarte-Ramos, F., Cabrita, J., 2006. Using a pharmacoepidemiological approach to estimate diabetes types 2 prevalence in Portugal. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 15, 269-274.

Elias, J. A. Z., Delfino, V. D. A., Barbosa, D. S., Fabris, B. A., Matsuo, T., 2008. Efeito do Ramipril e da Sinvastatina sobre o estresse oxidativo de ratos diabéticos. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia* 52, 1131-1137.

Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. and Grodsky, G.M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes, *Endocrine Reviews* 23, 599-622.

Ferreira, E.B., Fernandes, L.C., Galende, S.B., Cortez, D.A.G., Bazotte, R.B., 2008. Hypoglycemic effect of the hydroalcoholic extract of leaves of *Averrhoa carambola* L. *Brazilian Journal* 18, 339-343.

Fonseca-Alaniz, H. M., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., Lima, F. B., 2006. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia* 50, 216-229.

Forgiarini Junior, L.A., Kretzmann, N.A., Porawski, M., Dias, A.S., Marroni, N.A.P., 2009. Experimental diabetes mellitus: oxidative stress and changes in lung structure. *Journal Brasileiro de Pneumologia* 35, 788-791.

Fuentes, O., Arancibia-Avila, P., Alarcon, J., 2004. Hypoglycemic activity of *Bauhinia candicans* in diabetic induced rabbits. *Fitoterapia* 75, 527- 532.

Funari, C.S., Ferro, V.O., 2005. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 15, 178-182.

Funke, I., Melzig, F., 2006. Traditionally used plants in diabetes therapy- phytotherapeutics as inhibitors of α -amylase activity. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 16, 1-5.

Gray A. M, Flatt P. R., 1998. Antihyperglycemic actions of *Eucalyptus globulus* (*Eucalyptus*) are associated with pancreatic and extra-pancreatic effects in mice. *Journal of Nutrition* 128, 2319-2323.

Gray A.M., Flatt P.R., 1999. Insulin-releasing and insulinlike activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (*Coriander*). *British Journal of Nutrition* 81, 203-209.

Gross, J.L., Silveiro, S.P., Camargo, J.L., Reichelt, A.J., Azevedo, M.J., 2002. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia* 46.

Guarim Neto, G., Morais, R.G., 2003. Medicinal plant resources in the Cerrado of Mato Grosso. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561–584.

Guerra, R.N.M. & et al. Immunomodulatory properties of *Alternanthera* Jalil, A.M., Ismail, A., Pei, C.P., Hamid, M. and Kamaruddin, S.H. 2008. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (ob-db) rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7877–7884.

[Http://www.febrafarma.org.br](http://www.febrafarma.org.br)

Karisson, H. K. R., Zierath, J. R., 2007. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem Biophys* 48, 103-113.

Kasiviswanath R, Ramesh A, Kumar KE 2005. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Gmelina asiatica* Linn. in normal and in alloxan induced diabetic rats. *Biol Pharm Bull* 28, 729-732.

Kuriyan, R., Rajendran R., Bantwal, G., Kurpad, A., 2008. Effect of supplementation of *Coccinia cordifolia* extracto newly detected diabetic patients *Diabetes Care* 31, 216-220.

Latha M., Pari L., 2004. Effect of an aqueous extract of *Scoparia dulcis* on blood glucose, plasma insulin and some polyol pathway enzymes in experimental rat diabetes. *Braz J Med Biol Res* 37, 577-586.

Latorraca M.Q., Carneiro E.M., Mello M.A.R., Boschero A.C., 1999. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *J. Nutr. Biochem.* 10, 37-43.

Lemos. C.M., 2006. Efeito do pd 153035, um inibidor tirosina quinase, na sinalização da insulina e metabolismo da glicose. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Lenzen, S. 2008. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochemical Society* 36, 343-347.

Li W., Dai Y.H., Yu R.J., Li L., Wu C.M., Luan W.W., Meng W.W., Zhang X.S., Deng Y.L., 2007. Antihyperglycemic effect of *Cephalotaxus sinensis* leaves and GLUT-4 translocation facilitating activity of its flavonoid constituents. *Biol Pharm Bull* 30, 1123-1129.

Liang Y., Matschinsky F.M., 1994. Mechanisms of action of non glucose insulin secretagogues. *Ann Rev Nutr* 14, 59-81.

Lojudice, F. H., 2008. Stem cells in the treatment and cure of diabetes mellitus. *Ciência e Saúde Coletiva* 13, 15-22.

Mai T.T., Chuyen N.V., 2007. Anti-hyperglycemic activity of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 69-76.

Maiti R, Das UK, Ghosh D 2005. Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* 28, 1172-1176.

Maroo J., Vasu V.T., Aalinkeel R., Gupta S., 2002. Glucose lowering effect of aqueous extract of *Enicostemma littorale* Blume in diabetes: a possible mechanism of action. *J Ethnopharmacol* 81, 317-320.

Martinez, C.R., Chanway, C.P., Albertini, A.V.P., Figueiredo, M.V.B., Sampaio, A.H., Catellon, R.R., 2004. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. *FEMS Microbiology Letters* 238, 17-22.

Melo, J. G. et al., 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-daíndia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). *Acta Botanica Brasílica* 21, 27-36.

- Milanski, M., Souza, K. L. A., Reis, S. R. L., Feres, N. H., Souza, L. M. I., Arantes, V. C., Carneiro, E. M., Boschero, A.C., Reis, M. A. B., Latorraca, M. Q., 2009. Soybean diet modulates acetyl-coenzyme A carboxylase expression in livers of rats recovering from early-life malnutrition. *Journal of Nutrition* 25, 774-781.
- Nagarajan N.S., Murugesh N., Kumaresan P.T., Radha N., Murali, A., 2005. Antidiabetic and antihyperlipemic effects of *Cleomea felina*. *Fitoterapia* 76, 310-315.
- Neto, D. G., Gomes, M.B., 2009. Diabetology & Metabolic Syndrome: providing an open Access future for diabetes research. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 1:1.
- Newsholme, P., Haber E.P., Hirabara S.M., Rebelato E.L., Procopio J., Morgan D., Oliveira-Emilio H.C., Carpinelli A.R. and Curi R. 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity, *The Journal of Physiology* 583, 9-24.
- Oberley, L.W. 1988. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine* 5, 113-124.
- Ojewole, J.A., Adewonmi, C.O., 2004. Anti-inflammatory and hypoglycaemic effect of *Tetrapleura tetrapera* (Taub) [Fabaceae] fruit aqueous extract in rat. *Journal of Ethnopharmacology* 95, 177-182.
- Pepato, M. T.; Bavieria, A. M.; Vendramini, R. C.; Perez, M. P. M. S.; Kettelhutt, I. C.; Brunetti, I. L., 2003. *Cissus sicyoides* (princess vine) in the long-term treatment of streptozotocin-diabetic rats. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37, 15-20.
- Rates, S.M.K., 2001. Plants as sources of drugs. *Toxicon* 39, 603 - 613.
- Robertson, R.P. and Harmon, J.S., 2006. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet beta cell, *Free Radical Biology & Medicine* 41, 177-184.
- Rocha, F.D., Teixeira, V. L., Pereira R.C., Kaplan, M. A. C., 2006. Diabetes mellitus and oxidative stress: natural products as target of new therapeutics types. *Revista Brasileira de Farmácia* 87, 49-54.
- Rosendo Augusto Yunes, Valdir Cechinel Filho (orgs.) 2009. *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia* – 2. Ed. – Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí.
- Santos, H. B., Filho, J. M., Diniz, M.F.F.M., Vasconcelos, T.H.C., Pereira, F.S.B., Ramalho, J. A., Dantas, J. G., Santos, E. B., 2009. Clinical trials with the leaves of *Cissus sicyoides* L. (vitaceae) in glucose-intolerant and in type 2 diabetic patients. *RBAC* 41, 35-42.
- Santos, H. B.; Diniz, M. F. F. M.; Modesto-Filho, J.; Vasconcelos, T. H. C.; Ramalho, J. A. Avaliação da ação hipoglicemiante de *Cissus sicyoides* em pacientes intolerantes à glicose. Trabalho apresentado na modalidade PAINEL durante o I

Encontro de Pós-Graduação de Centro de Ciências de Saúde/UFPB, realizado no período de 29/11 a 01/12/2006.

Sarkhail, P., Rahmanipour S., Fadyevatan S., Mohammadirad A., Dehghan G., Amin G., Shafiee A. and Abdollahi M., 2007. Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes, *Pharmacological Research* 56, 261-266.

Sevilla, L., Tomas, E., Munoz, P., Gumã, A., Fischer, Y., Thomas, J., Montasell, B. R., Testar, X., Palacín, M., Zorzano, A., 2008. Characterization of two distinct intracellular GLUT4 mambrane populations in muscle fiber. Differential protein composition and sensitivity to insulin. *Journal of Endocrinology* 138, 3006-3015.

Shan J.J., Yang M., Ren J.W., 2006. Anti-diabetic and hypolipidemic effects of aqueous-extract from the flower of *Inula japonica* in alloxan-induced diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 29, 455-459.

Sharma S.B., Nasir A., Prabhu K.M., Murthy P.S., Dev G., 2003. Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan induced diabetic rabbits. *J Ethnopharmacol* 85, 201-206.

Silva, F. R. M. B., Szpoganicz, B., Pizzolatti, Willrich, M. A. V., Sousa, E., 2002. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and aloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 33-37.

Souza, V. H., Barbosa, A. P. O., Cardoso, G. C., Marreto, R. N., Filho, J. A. S. B., Antonioli, A. R., Santos, M. R. V., 2009. Avaliação do potencial antidiabético de cinco plantas medicinais em ratos. *Latin American Journal of Pharmacy* 28, 609-612.

Tresvenzol, L. M. et al., 2006. Estudo sobre o comércio informal de plantas medicinais em Goiânia e cidades vizinhas. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3, 23-28.

Turrolla, M. S. dos R.; Nascimento, E. de S., 2006. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42, 289-306.

Volp, A.C.P., Rezende, F.A.C., Alfenas, R.C.G., 2008. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica* 23, 158-184.

Waisundara, V.Y., Hsu A., Huang D. and Tan B.K. 2008. *Scutellaria baicalensis* enhances the antidiabetic activity of metformin in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats, *The American Journal of Chinese Medicine* 36, 517-540

Wang, Z.Q., Ribnicky D., Zhang X.H., Raskin I., Yu Y. and Cefalu W.T. 2008. Bioactives of *Artemisia dracunculus* L enhance cellular insulin signaling in primary human skeletal muscle culture, *Metabolism: Clinical and Experimental* 57,

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H., 2004. Global prevalence of diabetes. *Diabetes care* 27, 1047-1053.

Xie J.T., Wang C.Z., Wang A.B., Wu J., Basila D., Yuan C.S., 2005. Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of *Panax ginseng*. *Acta Pharmacol Sin* 26,1104-1110.

Xie W., Wang W., Su H., Xing D., Cai G., Du L., 2007. Hypolipidemic mechanisms of *Ananas comosus* L. leaves in mice different from fibrates but similar to statins. *J Pharmacol Sci* 103, 267-274.

Yokozawa, T., Yamabe N., Kim H.Y., Kang K.S., Hur J.M., Park C.H. and Tanaka T. 2008. Protective effects of morroniside isolated from *Corni Fructus* against renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 31, 1422-1428.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o mecanismo de ação antidiabética do extrato bruto etanólico (EBEtOH) da *Vatairea macrocarpa*.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar as células β insulino reativas de animais diabéticos tratados com o extrato da *V. macrocarpa*.
- Determinar o conteúdo de insulina pancreática nos animais diabéticos tratados com o extrato e sem tratamento.
- Avaliar a secreção estática de insulina por ilhotas isoladas de animais não diabéticos em várias concentrações de glicose e extrato da *V. macrocarpa*.
- Verificar o efeito do extrato sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo retroperitoneal, fígado e músculo EDL de animais diabéticos.
- Avaliar o efeito do extrato sobre a expressão da PEPCK.
- Avaliar o efeito antioxidante “in vitro” e “in vivo” do extrato da *V. macrocarpa*.

3. ARTIGO 1

Antidiabetic activity of stem-bark ethanolic extract of *Vatairea macrocarpa*. Part 1: Investigation of pancreas insulin secretion

Authors

Paula Domingues Babiloni¹, Máisa Pavani dos Santos¹, Gustavo Mitsuo Aiko¹, Letícia Martins Ignácio de Souza², Silvia Regina de Lima Reis², Márcia Queiroz Latorraca², Edson Moleta Colodel³, Paulo Teixeira de Sousa Júnior¹, Amanda Martins Baviera¹, Nair Honda Kawashita^{1*}

1Department of Chemistry, Federal University of Mato Grosso, Brazil

2Faculty of Nutrition, Federal University of Mato Grosso, Brazil

3Department of Veterinary, Federal University of Mato Grosso, Brazil

*** Corresponding author**

Tel.: +55 65 3615 8765

Fax: +55 65 3615 8798/99

E-mail address: nairhonda@terra.com.br (N.H. Kawashita)

Abstract

Previous studies from our laboratory have demonstrated the antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* stem-bark ethanolic extract in diabetic rats treated during 21 days, reducing serum and urinary glucose and urinary urea, increasing liver glycogen content and improving other parameters related to diabetes. The objective of this study was to evaluate the mechanisms of action of *V. macrocarpa* stem-bark extract, through beneficial action investigation of this extract on the pancreas. It was evaluated through pancreatic insulin content determination and detection of reactive-insulin cells by pancreatic immunohistochemistry of diabetic animals (streptozotocin), either treated (500 mg/kg, oral vial, by 21 days) or non-treated with extract. Other experiments, in which the islets insulin secretion of non-diabetic rats was evaluated in the presence of various glucose (2.8, 8.3 and 16.8 mmol/mL) and extract (0.0, 0.01, 0.1, 1 and 5 mg/mL) concentrations, were carried out with the same aim described above. The immunohistochemistry showed an increase in the amount of β reactive-insulin cells of the pancreas of the treated animals, which seem not to promote great benefits for the pancreatic function, an increase in pancreas insulin content of these animals was not observed. The results from static insulin secretion showed an increase of the secretion only in basal glucose concentration (2.8 mM) and in the presence of the 0.1 and 0.01 mg/mL of extract. These results seem to indicate that the extract could present some benefits in secretion but not in insulin synthesis. Thus we can conclude that the extract is not responsible for significant alterations in pancreatic function, which can explain the antidiabetic actions observed.

Keywords: Diabetes mellitus, *Vatairea macrocarpa*, Mechanism of action

1. Introduction

Ethnobotanical research shows the popular use of the *Vatairea macrocarpa* stem-bark (Benth) Ducke (Leguminosae) for diabetes treatment (Carvalho, 2004; Guarin-Neto, 2003) in several regions of Brazil. Pharmacological and chemical studies on *V. macrocarpa* found in literature up to 2008 refers specifically to the lectins present in its seeds and the relationship of these substances with anti-inflammatory and immune-modulatory activities (Alencar, 2003; Alencar, 2004; Martinez, 2004).

A study carried out by Oliveira et al. and published in 2008 shows a consistent antidiabetic action of the *V. macrocarpa* extract when administered chronically. The work shows that streptozotocin-induced diabetic rats treated with the extract presented improvement in all the parameters evaluated. The effect of the extract on increased urea excretion, reduction in weight gain and the increased intake of water and food, characteristically found in diabetic animals, were followed up during this period along with glycaemia and glycosuria, increased in Diabetes. The weight of several adipose tissue depots and the hepatic glycogen content, quite reduced in Diabetes as a result of the absence of the anabolic action of insulin, were determined at the end of the experiments.

Due to the fact that Diabetes mellitus can result from impaired insulin secretion and/or reduced insulin signaling in peripheral tissues (Dornas et al., 2008), experiments have been conducted in our laboratories in order to investigate whether the beneficial action of the extract occurred on the pancreas and/or the peripheral tissues. The data obtained in the study carried out on evaluation insulin-secretory function of the pancreas are present in this work.

The endocrine pancreas is formed by islets of Langerhans containing four cell types (α , β , γ , PP). In rodents, each islet is composed by about 2000 to 4000 cells, from which 70 to 80% are β cells that produce insulin (Ferreira et al., 2003 apud Milanski et al., 2005). The function of β cells is to secrete appropriate amounts of insulin in response to nutrients, hormones and nervous stimuli in order to maintain glycemie homeostasis. Insulin is synthesized as a prehormone which is converted in the endoplasmatic reticulum to proinsulin. It is transported in microvesicles to the Golgi complex and leaves the complex in storage vesicles.

Glucose is the main stimulus for insulin secretion by beta cells. The increase in glycolytic flux in β cells is directed preferentially to mitochondrial events, increasing the production of ATP. The increased ATP/ADP levels induce the blockage of K^+ channels sensitive to ATP located in the plasma membrane. The increase in the concentration of this cation leads to membrane depolarization opening Ca^{2+} channels, increasing its concentration in cytosol and triggering insulin-secretory mechanisms. The secretion stimulates synthesis of new insulin molecules, so that secretion is maintained until blood glucose falls (Boschero et al., 1984 apud Latorraca et al., 1999).

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of the hydroalcoholic extract of stem-bark of *V. macrocarpa*

Stem-bark of *V. macrocarpa* was collected in *Santo Antonio do Leverger*, State of Mato Grosso (MT), Brazil, in March 2006, and identified by the Bioscience Institute of the Federal University of Mato Grosso (UFMT). A voucher specimen (no.

25.528) was deposited at the Herbarium – (UFMT). The extract was prepared by maceration of dried stem-bark powder in 70% ethanol for 7 days, at room temperature. The extract was filtered, the ethanol evaporated under reduced pressure and dried in an oven at 40°C. After preparation, the dried powder extract was stored at 4°C. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Mato Grosso, Mato Grosso State, Brazil.

2.2. Animals

Male albino Wistar rats of body weight 180–210 g were selected for all experiments. Animals were kept in individual cages, maintained under 12/12 h light/dark cycles at room temperature (22–25°C). They were fed commercial stock diet and water *ad libitum*.

2.3. Induction of diabetes

Diabetes was induced by a single intravenous injection of freshly prepared streptozotocin (35 mg/kg) dissolved in 0.1M citrate buffer (pH 4.5), in rats previously fasted for 14 h. Animals with post-prandial glycaemia above 350-450 mg/dL, 5 days after streptozotocin administration, were considered diabetic. Five days after streptozotocin (diabetic rats) or citrate buffer (non-diabetic diabetic) injection, the animals were divided into three groups: Group DC – diabetic control rats; Group DT₅₀₀ – diabetic rats treated with 500 mg/kg of extract and NC - non-diabetic control rats. The groups received the extract or water orally by gavage, once a day, during 22 days.

2.4 Immunohistochemical evaluation on pancreas

The pancreas was removed immediately from each animal after as soon as it had been sacrificed and rinsed in ice-cold saline. The tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in paraffin wax before sectioning. Paraffin block samples were sectioned at 5 mm thickness and stained with hematoxylin and eosin for histological observation. Sections were dewaxed and rehydrated. After the step of washing in phosphate-buffered saline, sections were immersed in a solution of 3% H₂O₂ for 10 minutes. The sections were then pre-incubated with non-immune serum for 15 minutes and subsequently replaced with the mouse anti-insulin antibody (1:200, Dako, Santa Barbara, CA) for incubation at 48°C for 16 hours. Biotinylated goat anti-mouse immunoglobulin was used as a secondary antibody. The sections were then labeled with streptavidin-peroxidase following incubation with the secondary antibody at 37°C for 30 minutes. The location of the antigen was indicated by a brown color obtained with 3-amino-9-ethylcarbazole as chromogenic substrate for peroxidase activity.

2.5 Islet isolation and Insulin secretion

Islets from adult rats (g) were isolated by collagenase digestion of the pancreas as described (Boschero et al, 1996) to insulin secretions assays. For static incubations, groups of five islets were incubated for 90 min at 37°C in Krebs-bicarbonate buffer with the following composition (mmol/L): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56

CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 15 HEPES, supplemented with 3g of bovine serum albumin and equilibrated with a mixture of 95% O₂:5% CO₂ to give a pH of 7.4. This medium was supplemented with glucose at 2.8 mmol/L, 8.3 mmol/L or 16.7 mmol/L in presence or absence to different concentrations of *Vatairea macrocarpa* stem-bark extract. Thus, insulin secretion was measured in 0.01, 0.1, 1.0 or 5.0ng/mL extract plus glucose as secretagogue.

The insulin released and the total insulin content in pancreas was measured by radioimmunoassay using rat insulin as the standard (Scott et al, 1981).

2.6 Insulin of pancreatic content assay

The pancreatic tissue was extracted, homogenized in buffer acid alcohol (70% ethyl alcohol and hydrochloric acid 1N) and kept overnight under stirring at 4°C for the release of the contents in the medium. After centrifugation, aprotinin was added on supernatant and samples were stored at -80°C for analysis by radioimmunoassay as described above.

2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using the Statistic Software package (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Bartlett's test for the homogeneity of variances was initially used to determine whether the data complied with the assumptions for parametric analysis of variance. The one-way analysis of variance (ANOVA) was employed to analyze the data among treated groups and

their respective control groups (diabetic or non-diabetic). Differences were considered significant at $p < 0.05$, following by post hoc test.

3. Results

The immunohistochemistry of pancreas of DC animals shows a significant reduction in the number of insulin immune-reactive beta-cells, when compared to the pancreas of NC animals. A slight increase in the number of these cells is observed in pancreas of DT group treated with the extract. However, it is insignificant when compared to non-diabetic animals (Figure 1).

In Figure 2, it is possible to notice that the content of pancreatic insulin from diabetic animals (DC and DT₅₀₀) were not statistically different. However, when compared with non-diabetic group the content pancreatic insulin from diabetic groups was decreased. The data on action of the extract on insulin release in isolated islets, presented in Figure 3, shows an increase in insulin release in 2.8mM glucose and 0.1 and 1.0 mg of extract/mL. The extract did not alter insulin release by islets incubated in physiological (8.3mM) and supra-physiological (16.7mM) glucose concentration.

4. Conclusion and Discussion

The diabetes mellitus is a multifactorial disease. This fact justifies, at least in part, the unsatisfactory results in the treatment of the disease and in the control of glycaemia.

The pharmacological interventions clinically used in the treatment of diabetes include, beyond exogenous insulin, several drugs administered alone or associated.

They can act in different ways: in the pancreas, where they can stimulate the synthesis and/or insulin secretion; in the peripheral tissues improving the insulin signaling; at intestinal level inhibiting digestion and/or carbohydrate absorption; directly on the metabolic pathways which are important in glucose homeostasis (Lyra & Cavalcanti, 2006). Studies show that antidiabetic plants have the same mechanism of synthetic drugs used in diabetes treatment (Dornas et al., 2008).

Based on the fact that the appropriate secretion of insulin by the β -cells is essential in the pathogenesis and progression of the diabetes, this work investigated a possible beneficial action on pancreatic insulin-secretory function that could justify the antidiabetic action noticed by Oliveira et al. (2008).

For this purpose the following experiments were performed: a) pancreatic immunohistochemistry of normal control, diabetic animals both non-treated and treated with extract to detect insulin- reactive β cells; b) insulin released by isolated islets of non-diabetic animals were determined in basal, physiological and supra-physiological concentrations of glucose, in the presence and absence of the extract “in vitro”; c) insulin content was determined in the pancreas of the diabetic animals, both treated and non treated with the extract.

The extract seem no have contributed to regeneration the pancreatic β cells, neither the increase insulin biosynthesis, considering the similarity of the mean values of pancreatic insulin content in DC and DT₅₀₀ groups. This hypothesis was corroborated by immunohistochemistry results that just showed a discreet increase in β cells numbers in pancreas the treated animals, compared the cells numbers verified in pancreas the extract treat animals.

The increase in secretion of insulin only under basal concentration of glucose and any alterations in upper glucose concentrations suggest a stimulatory action of

the extract in the secretion without increasing insulin synthesis. In the early phase of insulin secretion, the hormone released is already present inside of the secretory granules. Later the maintenance of the secretion is dependent on the synthesis of insulin. Therefore the increase observed in the concentration of 2.8mM of glucose, could be the result of the release of insulin stored in the secretory granules. It would explain why we did not observe increase in insulin levels in the upper concentrations of glucose in the medium. Despite the close relationship between these two processes, some factors can alter one of them without altering the other (Gold, 1982). For example, the variation in the intracellular calcium concentration can increase the insulin secretion without affecting the synthesis. Several plants that have similar action are described in the literature (Krisanapun et al. 2009; Liu et al., 2009). However, this small effect of the *V.macrocarpa* extract on the pancreas seems insufficient to explain the antidiabetic effects and reinforce the findings of Oliveira et al. (2008) that the treatment of the diabetic animals with the extract reduced the index HOMA-IR. The reduction of the HOMA-IR suggests an efficient activity of the extract in peripheral tissues. Other actions of the extract, to explain their antidiabetic effect, are still being investigated in our laboratory

Acknowledgements

The authors are grateful to Air Francisco Costa for the excellent technical assistance and to the Brazilian foundations, *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso* (FAPEMAT), *Financiadora de Estudos e Projetos* (FINEP), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil* (CNPq) and *Centro de Pesquisa do Pantanal* (CPP) by the financial support.

This work is part of a dissertation presented by Paula Domingues Baveloni as a partial requirement for the Master's degree in Biosciences at the School of Nutrition, UFMT.

References

Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M.S., Alencar, V.B.M., Melo, S.C., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Cunha, F.Q., Ribeiro, R.A., 2003. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35, 1674–1681.

Alencar, N.M.N., Assreuy, A.M., Criddle, A.N., Souza, E.P., Soares, P.M., Havt, A., Aragão, K.S., Bezerra, D.P., Ribeiro, R.A., Cavada, B.S., 2004. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein and Peptide Letters* 11, 195–200.

Carvalho, A.R., 2004. Popular use, chemical composition and trade of Cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). *Environment, Development and Sustainability* 6, 307–316.

Dorna, W.C., Oliveira, T.T., Dore, R.G.R., Fabres, M.H.A., Nagem, T.J., 2008. Efeitos antidiabéticos de plantas medicinais 19, 488-500p.

Gold, G., Gishizky, M.L., Grodsky, G.M., 1982. Evidence that glucose "marks" beta cells resulting in preferential release of newly synthesized insulin. *Science* 218, 56-58.

Guarim Neto, G., Morais, R.G., 2003. Medicinal plant resources in the Cerrado of Mato Grosso. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561–584.

Krisanapun, C., Peungvicha, P., Temsiririrakkul, R., Wongkrajang, Y., 2009. Aqueous extract of *Abutilon indicum* Sweet inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in rodents. *Nutrition Research* 29, 579-587.

Latorraca, M.Q., Carneiro E.M., Mello, M.A.R., Boschero, A.C., 1999. Reduced insulin secretion in response to nutrients in islets from malnourished young rats is associated with a diminished calcium uptake. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 37-43.

Lyra, R., Cavalcanti, N., 2006. *Diabetes mellitus*, 1 ed. Digraphic, Rio de Janeiro.

Milanski, M., 2005. Redução da secreção de insulina e expressão de PkAa, mas não de PkCa, em ilhotas de ratas prenhes submetidas à restrição protéica" [Dissertação

de Mestrado] Cuiabá: Universidade Federal de Mato Grosso. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Martinez, C.R., Chanway, C.P., Albertini, A.V.P., Figueiredo, M.V.B., Sampaio, A.H., Catellon, R.R., 2004. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. FEMS Microbiology Letters 238, 17-22.

Oliveira, H.C., Santos, M.P., Grigulo, R., Lima, L., Martins, T.O., Lima, J.C.S., Stoppiglia, L.F., Lopes, C.F., Kawashita N.H., 2008. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* in rats. Journal of Ethnopharmacology 115, 515-519.

Schossler, D. R., Mazzanti, C. M., Luz, S.C.A., Filappi, A., Prestes, D., Silveira, A. F., Cecim, M., 2004. Alterações histológicas e imunohistoquímicas em pâncreas de ratos normais e diabéticos tratados com *Syzygium cumini*. Ciência Rural 34, 1821-1825.

Figures

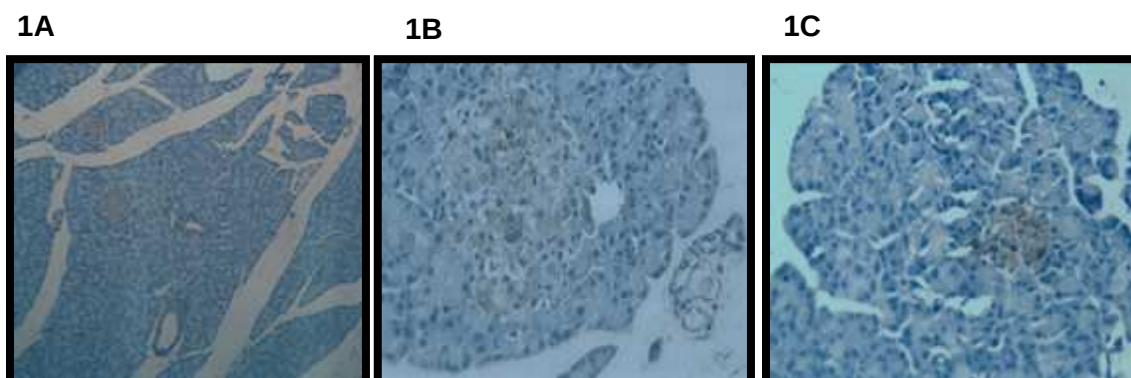


Figure. 1. Immunohistochemistry study of non-diabetic (NC) (1A), diabetic control (DC) (1B) and diabetic treated (DT) (1C) rats of 500 mg/kg of *V. macrocarpa* extract. The 1A, 1B and 1C figure showed the pancreatic islets of the β -cells immunocolored for insulin.

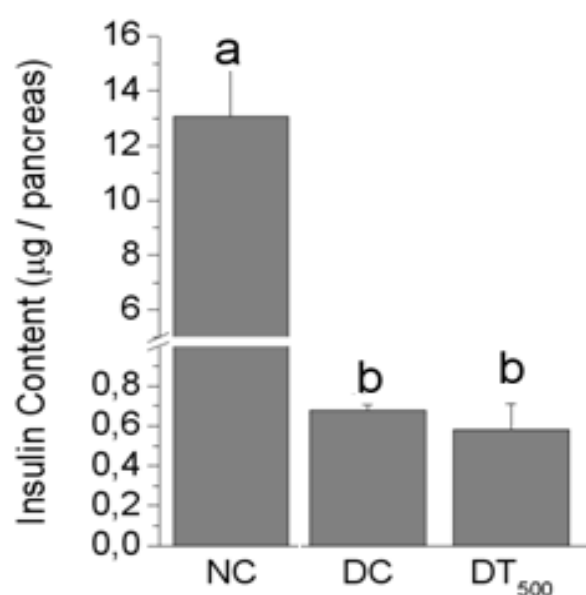


Figure 2. Total insulin content of pancreas from non-diabetic (NC), diabetic control (DC) and diabetic treated with 500 mg/kg of *V. macrocarpa* extract rats. The total insulin content of pancreas was determinate after 21 days treatment with extract. Data are expressed as mean $\pm$ standard error from 7 rats per group. Mean values within a column with unlike superscript letters were statistically different ($P < 0.05$, Anova one way test, following by post hoc test).

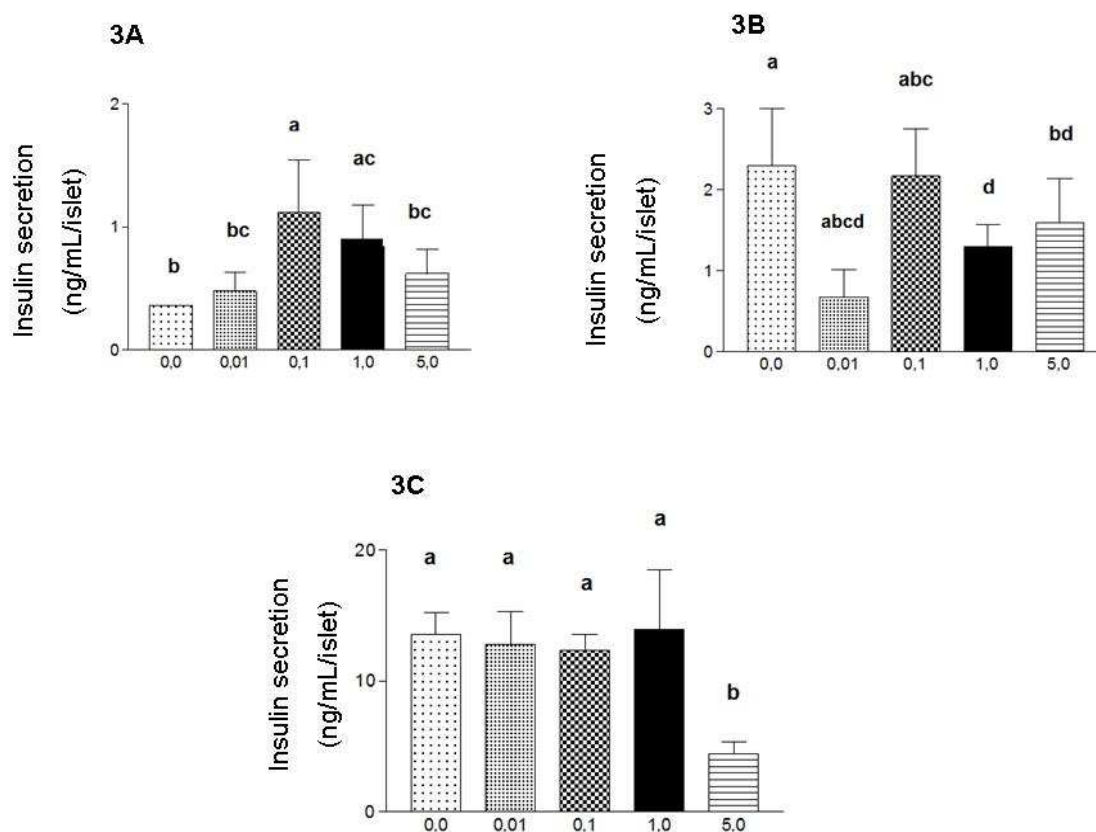


Figure 3. Insulin release by islets from non-diabetic rats in response to stimuli with 2.8 mmol (3A), 8.3 mmol (3B) and 16.8 mmol (3C) of glucose. The islets were incubated in absence (0.0 mg/mL) or presence of different concentrations (0.01, 0.1, 1 and 5 mg/mL) of extract of *V. macrocarpa*. The bars mean $\pm$ standard error. Mean values within a column with unlike superscript letters were statistically different ($P < 0.05$, Anova one way test, following by post hoc test).

4. ARTIGO 2

Antidiabetic activity of stem-bark ethanolic extract of *Vatairea macrocarpa*. Part 2: Mechanism of action in peripheral tissues

Authors

Paula Domingues Babiloni¹, Máisa Pavani dos Santos¹, Gustavo Mitsuo Aiko¹, Silvia Regina de Lima Reis², Márcia Queiroz Latorraca², Virginia Claudia da Silva¹, Evandro Luiz Dall'Oglio¹, Paulo Teixeira de Sousa Júnior¹, Carbene França Lopes¹, Amanda Martins Baviera¹, Nair Honda Kawashita^{1*}

1Department of Chemistry, Federal University of Mato Grosso, Brazil

2Faculty of Nutrition, Federal University of Mato Grosso, Brazil

*** Corresponding author**

Tel.: +55 65 3615 8765

Fax: +55 65 3615 8798/99

E-mail address: nairhonda@terra.com.br (N.H. Kawashita)

Abstract

Aim of the study: Since previous studies from our laboratory have demonstrated the antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* stem-bark ethanolic extract in diabetic rats treated during 21 days, reducing serum and urinary glucose and urinary urea, increasing liver glycogen content and improving others parameters related to diabetes. The objective of this study was to evaluate the mechanisms of action of *V. macrocarpa* stem-bark extract, through investigation of the insulin signaling pathways in the peripheral tissues (liver, adipose and skeletal muscle tissues) from diabetic rats. The liver protein levels of PEPCK, a regulatory enzyme of gluconeogenesis, and the antioxidant activity of *V. macrocarpa* extract through analysis of free radical scavenging activity (in vitro assay) and plasma and liver malondialdehyde levels (in vivo assay) has also been investigated.

Material and methods: Streptozotocin-induced diabetic rats were divided into two groups: diabetic control (DC) and treated (DT) during 21 days with *V. macrocarpa* stem-bark ethanolic extract (VmEtOH). The alterations on the insulin signaling in liver, retroperitoneal white adipose tissue (RWAT) and EDL muscles were investigated through determination of IR and AKT protein levels and of AKT phosphorylation levels using Western blotting analysis. This same methodology was used to evaluate the PEPCK protein levels in liver from these animals. The lipid peroxidation was determined through analysis of liver and plasma malondialdehyde (MDA) levels.

Results: The treatment with VmEtOH increased the protein levels of IR and the basal phosphorylation levels of AKT in liver, content (or expression) of IR from liver of diabetic rats in comparison to the diabetic non-treated group. The insulin-stimulated AKT phosphorylation levels were higher in liver from diabetic treated group. The PEPCK protein levels of PEPCK were reduced in liver from diabetic rats treated with VmEtOH. The plant extract also presented an antioxidant activity, since the extract inhibited DPPH radical formation and decreased MDA concentration in both plasma and liver from treated diabetic rats.

Conclusions: Data from this work suggest that the antihyperglycemic activity of the stem-bark extract of *V. macrocarpa* may occur through stimulation of insulin signaling pathways in peripheral tissues from STZ-diabetic rats, mainly in skeletal muscle and adipose tissue (probably promoting increase in the glucose uptake) and liver (increasing glycogen synthesis). The concomitant decrease of hepatic PEPCK protein levels could be associated to inhibition of gluconeogenesis, also contributing to the glycemia reduction after plant treatment. It has also demonstrated preliminary results related to the antioxidant activity of *V. macrocarpa*, with inhibition of lipid peroxidation (decreased plasma and liver MDA levels) in treated-diabetic rats.

Keywords: Diabetes mellitus, *Vatairea macrocarpa*, peripheral tissues, insulin signaling cascade, gluconeogenesis, antioxidant activity

1. Introduction

Diabetes mellitus is a congenital or acquired group of metabolic disorders characterized by defects in pancreatic insulin production and/or in insulin action on peripheral tissues, leading to abnormalities in carbohydrate, fat and protein metabolism. Hyperglycemia is the main well known consequence of this disorder, and its maintenance is considered a key factor in the development of several chronic complications that contribute to the morbidity and mortality observed in diabetes. In addition to the classic metabolic complications of diabetes mellitus, considerable attention has been given to the role of oxidative stress in the etiology and pathogenesis of diabetes (Evans et al., 2002; Newsholme et al., 2007). Thus, the oxidative stress associated with diabetes results from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) formation and endogenous antioxidant defense activity and seems to be a consequence, among several factors, from the prolonged exposure to hyperglycemia (Sarkhail et al., 2007).

Based on World Health Organization or American Diabetes Association methodologies, studies from several countries have estimated that there will be 285 million people with diabetes worldwide in 2010 and projected to rise to 439 million in 2030 (Shaw et al., 2010), and 90% of the disease cases are mainly related to type 2 diabetes mellitus, characterized by peripheral insulin resistance. At the molecular level, the peripheral insulin resistance can be explained by disruption on hormone signal transduction, affecting glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissues (Kahn, 1998; Saltiel, 2001). In this way, defects on insulin signaling can occur at several levels, including the insulin receptor (IR) and downstream effectors such as insulin receptor substrates (IRSs) and AKT, a serine/threonine kinase activated by

phosphorylation and that accounts for several intracellular metabolic actions of insulin. Among these actions included the glucose transporter 4 (GLUT4) translocation to the plasma membrane surface, increasing cellular glucose uptake. Several hypoglycemic agents that increase the insulin sensitivity, mainly metformin and glitazones, have been currently used to diabetes treatment. However, due to a number of limitations related with these drugs, such as adverse effects and excessive cost, besides the great and unexplored source of potentially useful drugs derived from plants. A broad range of ethnopharmacological studies have been contributing to the selection of plants with confirmed antidiabetic effects as well as elucidating the mechanisms of action that explain their hypoglycemic activity, allowing the isolation of phytochemicals for the development of new hypoglycemic drugs.

In this way, several Brazilian plant species have been used in traditional medicine for the treatment of diabetes mellitus. *Vatairea macrocarpa* (Benth) Ducke (Leguminosae) is a native wild tree of Brazilian savanna which is widely distributed all over country territory and has been extensively used in folk medicine to treat diabetes symptoms, as well as other diseases (Guarim Neto & Morais, 2003; Carvalho, 2004; Jesus et al., 2009). Recent studies from our laboratory have demonstrated that streptozotocin-induced diabetic rats treated with ethanolic extract of *V. macrocarpa* stem-bark (500 mg/kg) showed reduction in serum and urinary glucose, urinary urea, food and fluid intake, and increase in body weight gain. In the oral glucose tolerance test, the time to reach maximal glycemia values was greater in diabetic rats treated with 500 mg/kg of *V. macrocarpa* extract in comparison to control group (Oliveira et al., 2008). These findings may indicate that

V. macrocarpa effects could be related to an improvement in peripheral insulin resistance.

Hence, the objective of this present study was to investigate the *in vivo* effects of *V. macrocarpa* stem-bark extract on insulin signaling pathways in the primary targets of this hormone: liver, adipose and skeletal muscle tissues from diabetic rats. In addition, the liver expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), a regulatory enzyme of gluconeogenesis was investigated. Since several studies have demonstrated that, in addition to their antihyperglycemic effect, the antioxidant potential of plant preparations seems to be a novel and pertinent discovery to decrease diabetes complications. The present work also investigated the antioxidant activity of *V. macrocarpa* stem-bark extract assessing the free radical scavenging activity “in vitro” and evaluating the plasma and liver concentrations of malondialdehyde, an end product of lipid peroxidation “in vivo”.

2. Materials and Methods

2.1. Preparation of the ethanolic extract

Stem-bark of *V. macrocarpa* was collected in *Santo Antonio do Leverger*, State of *Mato Grosso* (MT), Brazil, in March 2006, and identified by Bioscience Institute of the Federal University of Mato Grosso (UFMT). The plant was identified and a voucher specimen (n^o 25528) is stored at the Central Herbarium - UFMT. *V. macrocarpa* ethanolic extract (VmEtOH) was prepared by maceration of dried plant

stem-bark powder in 70% ethanol for 7 days, at room temperature. The extract was filtered, the ethanol evaporated under reduced pressure and dried in an oven at 40°C. After preparation, the dried powder VmEtOH was stored at 4°C.

2.2. Animals

Male albino Wistar rats of 180-210 g body weight were selected for all the experiments. Animals were kept in individual cages in a room under standard laboratory conditions (12:12 hour light-dark cycle, 24±1°C) and were given free access to water and normal lab chow diet (Purina®Labina). All experiments took place between 08:00 and 10:00 AM. The animals were managed according to the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimental (CEPA) from UFMT.

2.3. Induction of diabetes in rats

Diabetes was induced by a single intravenous injection of freshly prepared streptozotocin (STZ, 35 mg/kg; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolved in 0.01M citrate buffer (pH 4.5), in rats previously fasted for 14h. Animals with post-prandial glycemia between 350-450mg/kg, five days after STZ administration, were used in the experiments. The animals were divided into two groups: DC group – diabetic control rats treated with vehicle (water) and DT group – diabetic rats treated with 500 mg/kg of VmEtOH. The groups received the extract or water orally by gavage, once a day, during 21 days. At the end of the experimental period, rats from both groups were used into two different experimental protocols: 1) investigation of

the alterations on insulin intracellular signaling in liver, adipose and muscle tissues and liver gluconeogenesis and, 2) analysis of *in vivo* antioxidant activity of VmEtOH.

2.4. Insulin signaling studies and liver gluconeogenesis

2.4.1. Sample collection and analyses

Rats from DC and DT groups were anaesthetized with an association of ketamine hydrochloride (Dopalen, Agribands) and xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer) (2:1). After confirmation of anesthesia through the loss of pedal and corneal reflexes, the abdominal cavity was opened, the portal vein exposed, and either isotonic sodium chloride solution (DC and DT non-stimulated groups) or 0.5 mL, 4U/mL of insulin (DC and DT stimulated groups) was injected. Before and after vehicle or insulin administration, fragments from different tissues were collected after 30 (liver), 90 (extensor digitorum longus - EDL muscles) and 120 seconds (retroperitoneal white adipose tissue - RWAT). Tissue samples were quickly removed to determine the protein levels of insulin signaling components IR and AKT, and the phosphorylation levels of AKT (serine-473 residue). Liver samples from DC and DT non-stimulated groups were collected and processed to analysis of alterations on PEPCK protein levels.

2.4.2. Immunoblotting

Fragments of liver, EDL muscles and RWAT were minced coarsely and homogenized immediately in 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 4°C containing

150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% SDS, 10mM sodium orthovanadate, 100mM sodium fluoride, 5µg/mL of aprotinin and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 50 min at 4°C and the resulting supernatant was used for determination of the protein content by Bradford's method using BSA as a standard. Samples containing 125 µg of protein from each experimental group were incubated for 5min at 80°C with 4x concentrated Laemmli sample buffer (1M sodium phosphate, 50% glycerol, 10% SDS, 100mM dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue, pH 7.0) and assayed on polyacrylamide gels at 120 V for 90 min, using 10% gels to AKT, p-AKT, IR and PEPCK analysis. Electrotransfer of proteins to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) was performed at 120 V for 120min using buffer containing 20% of methanol and 0.02% of sodium dodecyl sulfate. After checking transfer efficiency by Ponceau staining, the membranes were blocked with 10% non-fat dry milk in Tris buffered saline/Tween 20 (TBS-T; 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.5% Tween 20) for 1h. Protein levels of IR, AKT, p-AKT and PEPCK were detected after membrane incubation overnight at 4°C with primary antibodies anti-IR_β, anti-p-AKT1/2/3 (Ser 473) and anti-PEPCK (rabbit polyclonal, Santa Cruz, CA, USA), and anti-AKT (mouse monoclonal, Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:500 in TBS-T containing 5% dry albumin. Anti-histone (rabbit polyclonal, Santa Cruz, CA, USA) was used as internal control. Primary antibody was detected by peroxidase-conjugated secondary antibody (1:7,500) and visualized by Enhanced chemiluminescence reagents (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA) after incubation with a horseradish peroxidase- conjugated secondary antibody was used for detection. Band intensities were quantified using the ImageJ Program (Version 1.38).

2.5. Antioxidant activities studies

2.5.1. *In vitro* antioxidant activity – DPPH assay

The free radical scavenging activity of VmEtOH was determined based on their ability to react with stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical (Williams et al., 1995). The reaction mixture consisted of VmEtOH in crescent doses (0.5, 1, 2, 4, 8, 10 and 15 µg/mL) and 0.004% DPPH prepared in methanolic solution. There was used 10 µg/mL of ascorbic acid as positive control. After 30 min, the absorbance was measured at 517nm to determine the percentage of DPPH remaining. The antioxidant activity of VmEtOH was expressed as IC₅₀ (inhibitory concentration), defined as the concentration of sample required to inhibit the formation of DPPH radicals by 50%.

2.5.2. *In vivo* antioxidant activity – lipid peroxidation studies

The *in vivo* antioxidant activity of VmEtOH was assessed through investigation of malondialdehyde (MDA) concentrations in plasma and liver of diabetic rats. At the end of the subchronic experiments, rats from DC and DT groups were killed by deepening of anesthesia and plasma and liver samples were rapidly collected. Plasma samples were deproteinized to MDA determination according Pilz et al. (2000). Plasma (200µL) was added to 400µL of 1.5M NaOH, incubated at 60°C for 30 min. The samples were cooled on ice for 5min. It was added 400µL HClO₄ 10% in the samples and centrifuged at 10,000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant was

used to MDA quantification. Liver samples were homogenized (1g/4mL) in 1.15% KCl buffer, centrifuged at 4,000 rpm for 10 min at 4°C and supernatant was removed and used on analysis. The estimation of the lipid peroxidation was carried out by determination of thiobarbituric acid (TBA) reactive substances in liver and plasma samples (Konn & Livesedge, 1944). Supernatant (500µL) were added to 1mL of reaction mixture consisting of 0.14% thiobarbituric acid in phosphate buffer (pH 2.5) and heated at 90°C for 1h till a faint pink color appeared. After cooling, the color was extracted in 2mL buthanol and the absorption of MDA-TBA chromogen was measured at 535nm. The MDA concentration was expressed as µmol/L of plasma or as µmol/mg of tissue (liver).

2.6. Statistical analysis

Data were expressed as mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed using the Statistic Software package (Statsoft, Tulsa, OK, USA). Bartlett's test for the homogeneity of variances was initially used to determine whether the data complied with the assumptions for parametric analysis of variance. The Two-way analysis of variance (ANOVA) was employed in the comparison between DC and DT groups and/or insulin-stimulated groups with their respective controls. Student *t*-test was used in the comparison between DC and DT groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Insulin signaling in the liver of diabetic rats treated with VmEtOH

As observed in Fig.1A, the treatment with VmEtOH increased in 34% the protein content (or expression) of IR from liver of diabetic rats in comparison to diabetic non-treated group. Although the treatment did not alter the protein content of AKT in liver from diabetic rats (Fig.1B), increase in the basal phosphorylation levels of AKT (82%) in liver from treated-diabetic rats was observed when compared to the non-treated group (Fig.1C). In addition, insulin-stimulated AKT phosphorylation levels in the diabetic treated group were significantly higher (54%) than those in the diabetic control group (Fig.1C).

3.2. Insulin signaling in the RWAT of diabetic rats treated with VmEtOH

An increase of 117% in the IR protein levels in RWAT from diabetic rats treated with VmEtOH was observed (Fig.2A). AKT protein levels did not differ between the treated and non-treated diabetic groups (Fig.2B). The basal phosphorylation levels of AKT in RWAT from treated-diabetic rats were higher (84%) in comparison to non-treated group. Differences in the insulin-stimulated AKT phosphorylation levels between diabetic treated and non-treated groups were not observed (Fig.2C).

3.3. Insulin signaling in the EDL of diabetic rats treated with VmEtOH

The IR protein levels in RWAT from diabetic rats treated with VmEtOH were 80% increased in comparison to control group (Fig.2A). Differences in AKT protein levels between the groups were not found (Fig.2B). An increase of 122% in the basal phosphorylation levels of AKT in EDL from treated-diabetic rats was observed, in comparison to non-treated group. Similar that was observed with RWAT, the insulin-stimulated AKT phosphorylation levels in the diabetic treated group were not different from values obtained in the diabetic control group (Fig.3C).

3.4. PEPCK levels in the liver of diabetic rats treated with VmEtOH

Since several studies have suggested that the inhibition of the hepatic glucose production seems to be an important new target for diabetes treatment, the present work investigated the alterations promoted by the treatment of diabetic rats with VmEtOH in the protein levels of PEPCK, a key enzyme of the gluconeogenesis. As observed in Fig.4, the treatment with VmEtOH promoted a significant reduction of 21% in the protein levels of PEPCK in liver from diabetic rats.

3.5. In vitro antioxidant activity of VmEtOH

In this present work, the “in vitro” antioxidant activity of VmEtOH was determined through the DPPH assay. The DPPH radical scavenging activity of

VmEtOH was with an IC_{50} of 4.65 $\mu\text{g/mL}$. This extract activity was very similar to values found with ascorbic acid, which presented an IC_{50} of 4.00 $\mu\text{g/mL}$ (Fig.5).

3.6. MDA levels in plasma and liver of diabetic rats treated with VmEtOH

In this present work, lipid peroxidation levels were as evidenced by MDA levels determination in plasma and liver from diabetic rats treated with VmEtOH. In diabetic rats, the treatment with VmEtOH significantly inhibited the increase in MDA levels in both plasma (35%) and liver (36%) when compared to the diabetic non-treated group (Fig.6).

4. Conclusion and Discussion

Although previous studies from our laboratory have demonstrated the effects of the treatment with stem-bark extract of *V. macrocarpa*, improving several biochemical and physiological parameters in diabetic rats (Oliveira et al., 2008), the mechanisms of action by which this plant extract exerts its beneficial effects has remained unknown. In this way, the present study has demonstrated, for the first time, that VmEtOH stimulates insulin signaling cascades in peripheral tissues (liver, adipose tissue and skeletal muscle) explaining, at least in part, the antidiabetic activity related to *V. macrocarpa*.

The intracellular insulin signaling pathway involved in the control of a wide range of metabolic responses is well-known (White & Kahn, 1994; Balasubramanyam & Mohan, 2004; Schinner et al., 2005). The binding of insulin to its insulin receptor (IR) induces conformational changes that stimulate the receptor tyrosine kinase

activity by autophosphorylation. The activated IR promotes insulin receptor substrate (IRS) phosphorylation, recruiting the intracellular intermediate phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) which in turn leads to the phosphorylation of AKT, a serine/threonine kinase, via phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1). AKT is the main intermediary involved in the intracellular metabolic responses controlled by insulin. For example, AKT contributed to the insulin enhancement of glucose transport, stimulating the GLUT4-containing vesicle movement from cytoplasm to the cell membrane (Bryant et al., 2002). It has been suggested that the link between AKT and GLUT4 trafficking is the substrate AS160, a protein with a GAP homology domain that is phosphorylated by AKT in response to insulin (Kane et al., 2002). GAP proteins are involved in the regulation of the GTP/GDP cycle of Rab protein family, GTPases involved in several membrane trafficking processes (Deneka et al., 2003). In this way, insulin maintains blood glucose homeostasis, mainly by regulating the amount of the GLUT4 on the cell surface of fat and muscle cells. Since the treatment of diabetic rats with VmEOH promoted increases in IR protein levels and in basal AKT phosphorylation in both EDL muscles and RWAT (Figs. 2 and 3), it seems reasonable to speculate that the impaired insulin sensitivity in these tissues as consequence of diabetic state should be improved. In addition, the finding that the AKT protein levels did not alter in EDL and RWAT from diabetic rats treated with VmEOH corroborates the lack of further increase in AKT phosphorylation levels after insulin stimulation. Taken together, these findings suggest that the impaired GLUT4 translocation (and consequently the glucose uptake), typical of the STZ-diabetes condition, could be improved after treatment with *V. macrocarpa*. This hypothesis is totally in agreement with the previous findings of Oliveira et al. (2008) that observed reduction of glycemia values in diabetic rats after VmEtOH treatment. Additionally,

because plant extract treatment did not alter serum fasting insulin levels (Oliveira et al., 2008), the increased insulin sensitivity observed in peripheral tissues should be an effect promoted by some plant compounds, acting isolated or combined, exerting an insulin-like activity. In conclusion, more studies need to be carried out to confirm our findings, as example the analysis of the GLUT4 content in plasma membranes in peripheral tissues from rats treated with this plant extract.

It is well known that gluconeogenesis process is increased in human diabetes (Cline et al., 1994; Velho et al., 1996), contributing to the development of hyperglycemia. Thus, an inhibition of endogenous glucose production may be a mechanism of action of plant preparations to promote an antihyperglycemic response. Reduction of gluconeogenesis can be achieved through modulation of activity and/or gene expression of the enzymes present in the regulatory steps of this pathway, mainly the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). In this present study, we have demonstrated that PEPCK protein levels were reduced in liver from diabetic rats treated with VmEtOH (Fig.4). This finding clearly showed that the antihyperglycemic effect of the VmEtOH treatment is consequence, at least in part, to the inhibition of hepatic glucose production. In addition, the previous finding that urinary urea excretion was reduced after plant treatment is also in agreement with the decreased gluconeogenesis. Several studies have demonstrated medicinal plant preparations that reduce hyperglycemia after inhibition of hepatic glucose production in experimental models of diabetes in rats, mainly through inhibition of PEPCK. In this context, *Trigonella foenum-graecum* L. and resveratrol can be quoted as a natural polyphenol found in grape skin (Mohammad et al., 2006; Chi et al., 2007). Also in liver, it was observed increase in the IR protein levels, as well as in the basal and in the insulin-stimulated AKT phosphorylation levels (Fig.1). Based on these

results, we suggest that the hepatic glycogen synthesis could be increased after treatment with plant extract. It is well known that the phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) by AKT is the mechanism by which its activity is inhibited in response to insulin, and its substrate glycogen synthase is then dephosphorylated and activated. Our hypothesis can be corroborated by previous study from our laboratory that showed increase in hepatic glycogen content in diabetic rats treated with VmEtOH (Oliveira et al., 2008). Taken together, the improvement on liver glucose metabolism, leading to decrease in hepatic glucose production and increase in glycogen synthesis, can explain the hepatic mechanism of action related to the antihyperglycemic effect of *V. macrocarpa* in STZ-diabetic rats.

The oxidative stress has been postulated as a central factor in the pathogenesis of several chronic diseases, including diabetes, and exerts an important role in the development of many abnormalities that lead to some diabetic microvascular complications including retinopathy, nephropathy and neuropathy (Giugliano et al., 1995; Rahimi et al., 2005). Several studies have shown that chronic hyperglycemia in diabetic and insulin-resistant states is a key role in the oxidative stress generation (Rolo & Palmeira, 2006; Kawahito et al., 2009). Therefore, in an attempt to prevent or treat the diabetic complications, many efforts have been made to investigate novel compounds to be applied in the antioxidant therapy to promote the oxidative stress reversion in this pathology. So, in addition to their hypoglycemic effect, the antioxidant potential of plant preparations seems to be a novel and pertinent discovery to decrease diabetes complications linked to oxidative stress. In this way, the present study investigated initial insights into the antioxidant properties of *V. macrocarpa*, revealing that this plant presented an in vitro antioxidant activity, since its extract inhibited DPPH radical formation (Fig.5). This antioxidant activity of

the VmEOtH has been confirmed with *in vivo* experiments, showing that the increased MDA concentration in both plasma and liver from diabetic rats was reduced after treatment with VmEtOH (Fig.6). It is well known that lipid peroxide formation is involved in the development of cellular injury and MDA, an end product of lipid peroxidation that can be used as an indicator of oxidative stress. Since lipid peroxidation has been closely associated with diabetic complications (Davì et al., 2005; Grattagliano et al., 2008), the findings of our study showing decrease in MDA levels after plant treatment suggest that *V. macrocarpa* can reduce damaging consequences promoted by oxidative stress under diabetic conditions through the inhibition of lipid peroxidation. However, further investigation needs to be carried out to clarify if the antioxidant activity of *V. macrocarpa* could be mediated through reduction in the formation of reactive species and/or increase in the endogenous antioxidant defenses.

In summary, the present data suggest that the antihyperglycemic activity of the stem-bark extract of *V. macrocarpa* may occur through stimulation of insulin signaling pathways in peripheral tissues from STZ-diabetic rats, mainly in skeletal muscle and adipose tissue (probably promoting increase in the glucose uptake) and liver (increasing glycogen synthesis). The concomitant decrease of hepatic PEPCK protein levels could be associated to inhibition of gluconeogenesis, also contributing to the glycemia reduction after plant treatment. It has also demonstrated preliminary results related to the antioxidant activity of *V. macrocarpa*, with inhibition of lipid peroxidation (decreased plasma and liver MDA levels) in treated-diabetic rats.

Acknowledgements

The authors are grateful to Air Francisco Costa for the excellent technical assistance and to the Brazilian foundations, *Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso* (FAPEMAT), *Financiadora de Estudos e Projetos* (FINEP), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Brasil* (CNPq) and *Centro de Pesquisa do Pantanal* (CPP) by the financial support.

This work is part of a dissertation presented by Paula Domingues Baveloni as a partial requirement for the Master's degree in Biosciences at the School of Nutrition, UFMT.

References

- Balasubramanyam, M., Mohan, V., 2004. Insulin signaling in diabetes: cascades and complexities. *Advanced Biotechnology*, 2, 24-27.
- Bryant, N.J., Govers, R., James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 3, 267–277.
- Carvalho, A.R., 2004. Popular use, chemical composition and trade of Cerrado's medicinal plants (Goiás, Brazil). *Environment, Development and Sustainability* 6, 307-316.
- Chi, T.C., Chen, W.P., Chi, T.L., Kuo, T.F., Lee, S.S., Cheng, J.T., Su, M.J., 2007. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sciences*. 80, 1713-20.
- Cline, G.W., Rothman D.L., Magnusson I., Katz L.D. and Shulman G.I. 1994. ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 2369-2376.
- Davì, G., Falco, A., Patrono, C., 2005. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* 7(1-2), 256-68.
- Deneka, M., Neeft, M., Van der Sluijs, P., 2003. Regulation of membrane transport by rab GTPases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 38, 121-142.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 23, 599-622.

Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G., 1995. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism* 44, 363–368.

Grattagliano, I., Palmieri, V.O., Portincasa, P., Moschetta, A., Palasciano, G., 2008. Oxidative stress-induced risk factors associated with the metabolic syndrome: a unifying hypothesis. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 491-504.

Guarim Neto, G., Morais, R.G., 2003. Medicinal plant resources in the Cerrado of Mato Grosso. *Acta Botanica Brasilica* 17, 561-584.

Jesus, N.Z., Lima, J.C., Silva, R.M., Espinosa, M.M., Martins, D.T., 2009. Ethnobotanical survey of plants popularly used as anti-ulcer and anti-inflammatory in Pirizal, Nossa Senhora do Livramento, MT, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19, 130-139.

Kahn, B.B., 1998. Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance, *Cell* 92, 593-596.

Kane, S., Sano, H., Liu, S.C., Asara, J.M., Lane, W.S., Garner, C.C., and Lienhard, G.E., 2002. A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 22115-22118.

Kawahito, S., Kitahata, H., Oshita, S., 2009. Problems associated with glucose toxicity: Role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World Journal of Gastroenterology* 15, 4137-4142.

Kohn, H. I., Liversedge, M., 1944. On a New Aerobic Metabo lite Whose Production by Brain Is Inhibited by Apomorphine, Emetine, Ergotamine, Epinephrine and Menadione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 82,292 .

Mohammad, S., Taha, A., Akhtar, K., Bamezai, R.N., Baquer, N.Z., 2006. In vivo effect of *Trigonella foenum graecum* on the expression of pyruvate kinase,phosphoenolpyruvate carboxykinase, and distribution of glucose transporter (GLUT4) in alloxan-diabetic rats, *Canadian journal of physiology and pharmacology* 84, 647-654.

Newsholme, P., Haber, E.P., Hirabara, S.M., Rebelato, E.L., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R., Curi, R., 2007. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *The Journal of Physiology* 583, 9-24.

Oliveira, H.C., Santos, M.P., Grigulo, R., Lima, L.L., Martins, D.T., Lima, J.C., Stoppiglia, L.F., Lopes, C.F., Kawashita, N.H., 2008. Antidiabetic activity of *Vatairea macrocarpa* extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 115, 515-519.

Pilz, J., Meineke, I., Gleiter, C., 2000. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sciences* 742, 315-325.

Rahimi, R., Nikfar, S., Larijani, B., Abdollahi, M., 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 365-73.

Rolo, A.P., Palmeira, C.M., 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology* 212, 167–178.

Saltiel, A.R., 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes, *Cell* 104, 517-529.

Schinner, S., Scherbaum, W.A., Bornstein, S.R., Barthel, A., 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabetic Medicine* 22, 674-682.

Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice* 87, 4-14.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordin, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 4350-4354.

Velho, G., Petersen K.F., Perseghin G., Hwang J.H., Rothman D.L., Pueyo M.E., Cline G.W., Froguel, P., Shulman, G.I., 1996. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects, *The Journal of clinical investigation* 98, 1755-1761.

Williams, W.B., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28, 25–30.

Figures

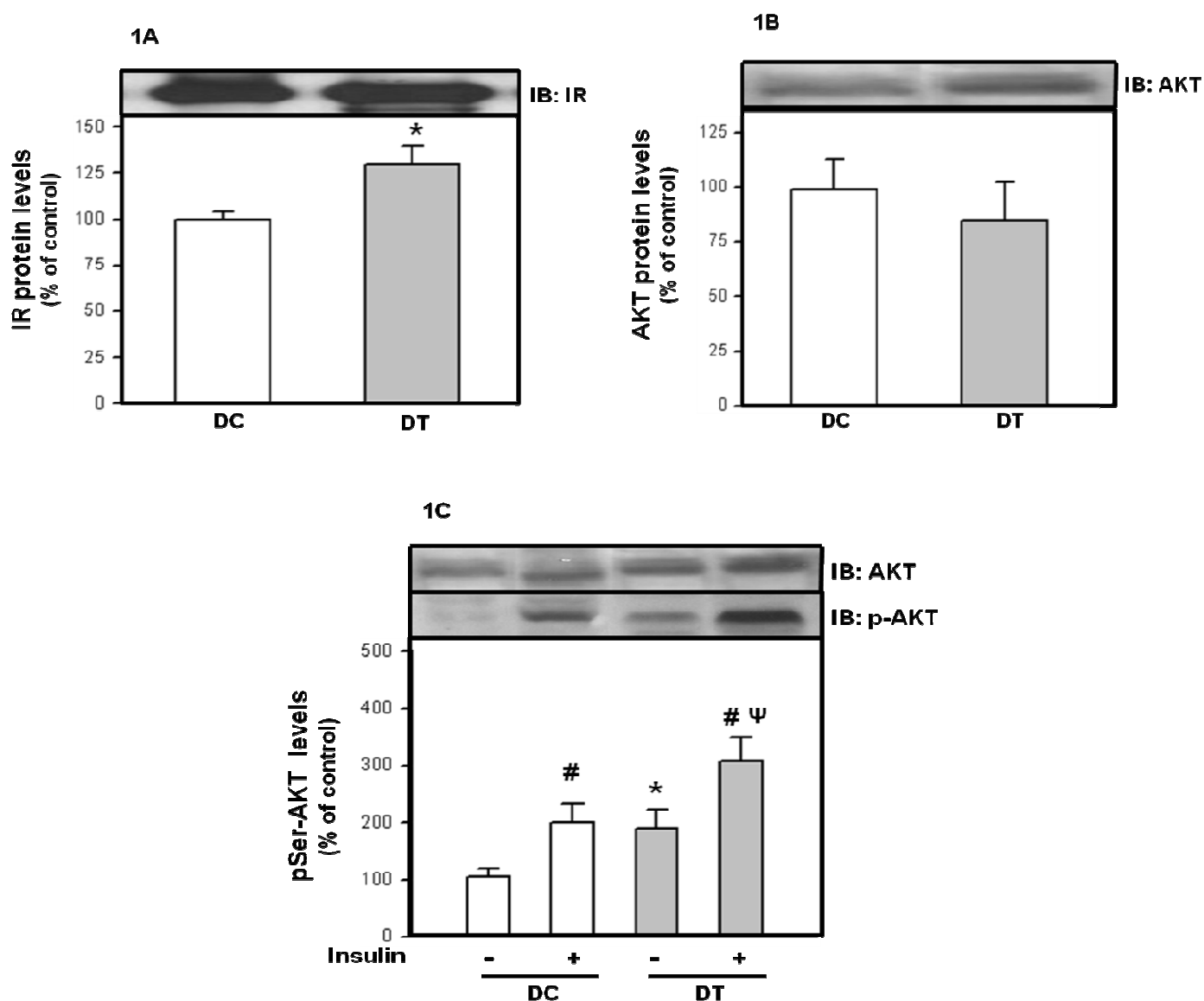


Figure 1. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in liver from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and liver fragments were obtained after 30-s. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 rats per group. DC = diabetic control and DT = diabetic treated rats. * $P < 0.05$ DT (-) vs DC (-), # $P < 0.05$ DC (+) vs DC (-) and DT (+) vs DT (-), $^{\Psi} P < 0.05$ DT (+) vs DC (+).

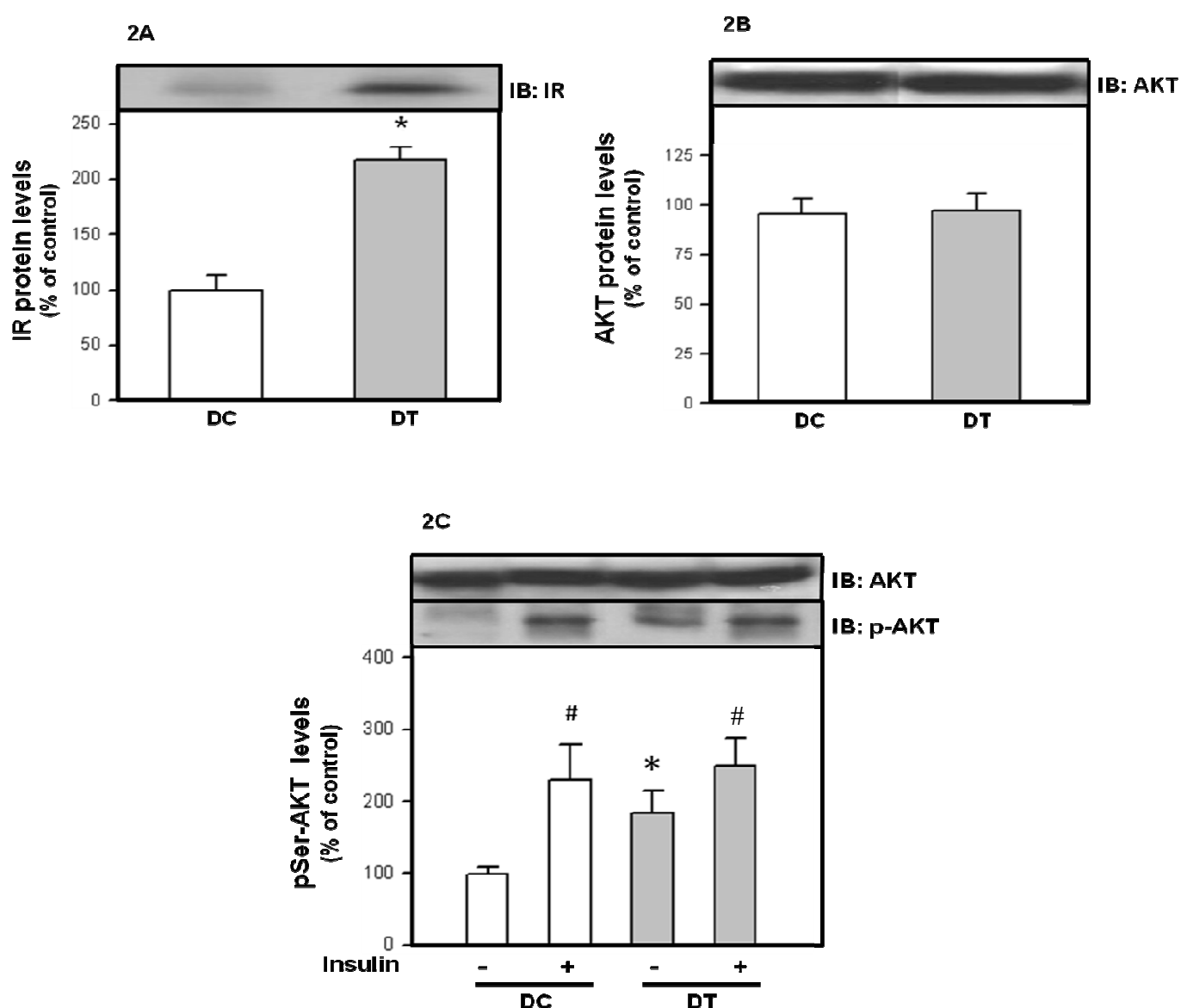


Figure 2. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in RWAT from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and RWAT fragments were obtained after 120-s. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 rats per group. DC = diabetic control and DT = diabetic treated rats. * $P < 0.05$ DT (-) vs DC (-), # $P < 0.05$ DC (+) vs DC (-) and DT (+) vs DT (-).

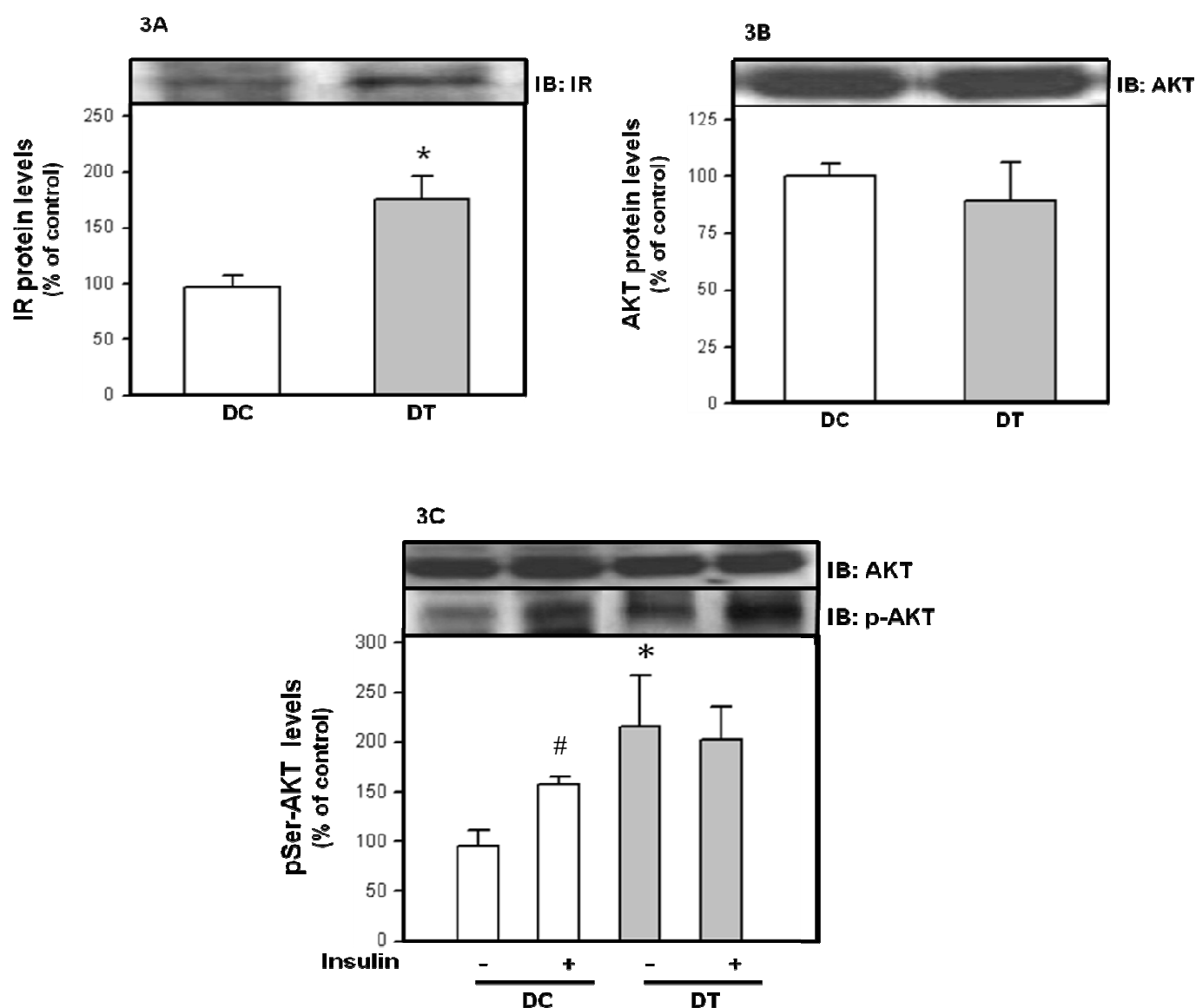


Figure 3. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on insulin signaling in EDL muscles from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-IR (1A), anti-AKT (1B) and anti-pSer473-AKT (1C). For Ser-AKT phosphorylation studies, rats were injected (+) or not (-) with insulin (0.5 mL, 4U/mL) via portal vein and EDL fragments were obtained after 90-s. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 rats per group. DC = diabetic control and DT = diabetic treated rats. * $P < 0.05$ DT (-) vs DC (-), # $P < 0.05$ DC (+) vs DC (-) and DT (+) vs DT (-).

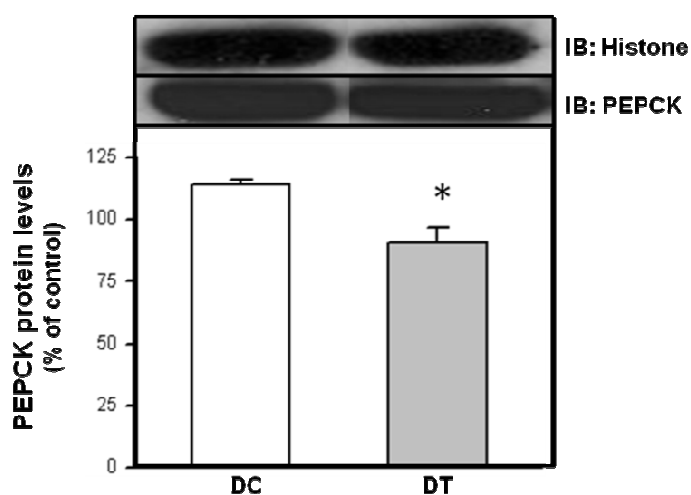


Figure 4. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on PEPCK protein levels in liver from diabetic rats. Immunoblotting (IB) anti-PEPCK. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 rats per group. DC = diabetic control and DT = diabetic treated rats. * $P < 0.05$ DT vs DC.

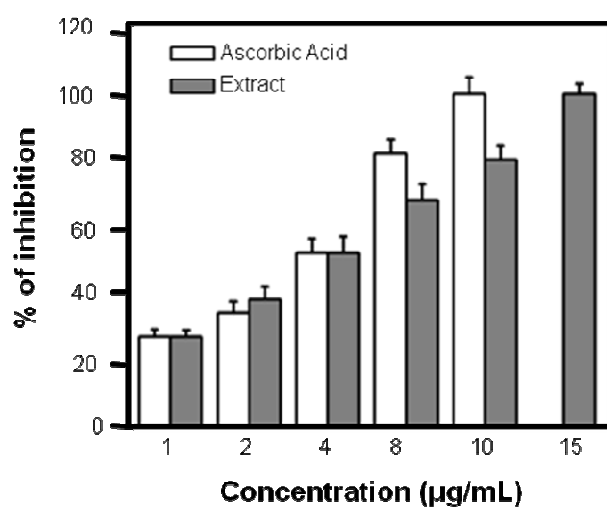


Figure 5. In vitro antioxidant effect of *V. macrocarpa* stem bark extract against DPPH scavenging capacity. Ascorbic acid was used as control. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 samples per concentration of plant extract.

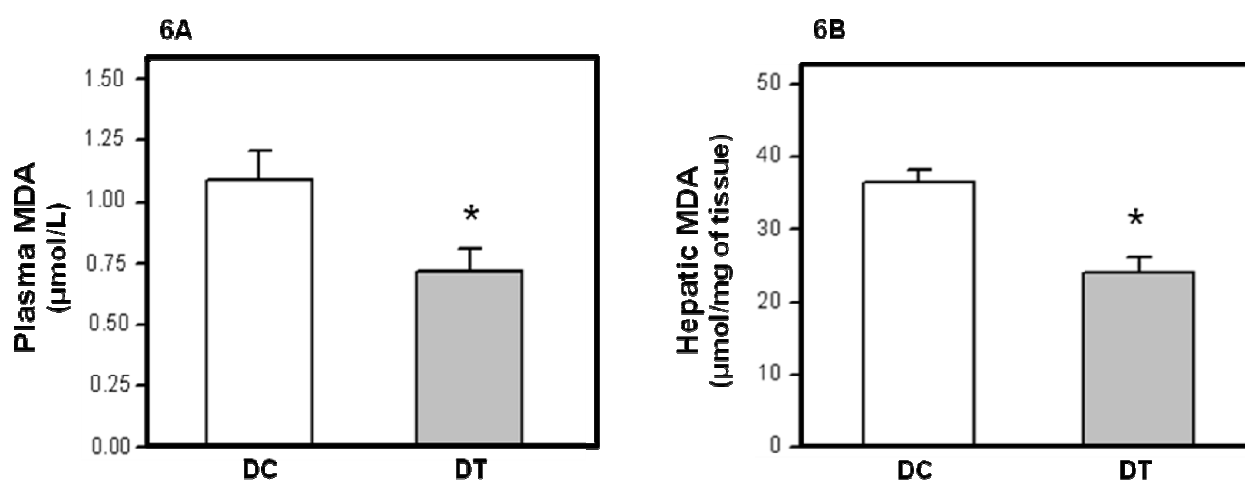


Figure 6. Effect of treatment with *V. macrocarpa* extract on MDA levels in plasma (6A) and liver (6B) from diabetic rats. Data are expressed as mean $\pm$ SE from 5-7 rats per group. DC = diabetic control and DT = diabetic treated rats. * $P < 0.05$ DT vs DC.