

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
REABILITAÇÃO**

Giovana Baldissera

**Efeitos da administração de extrato
bruto hidroalcoólico de folhas de
Syzygium cumini (L.) Skeels e do
treinamento aeróbico contínuo em ratos
diabéticos induzidos por dieta
hiperlipídica e baixas doses de
estreptozotocina**

**Porto Alegre
2015**

Giovana Baldissera

**Efeitos da administração de extrato
bruto hidroalcoólico de folhas de
Syzygium cumini (L.) Skeels e do
treinamento aeróbio contínuo em ratos
diabéticos induzidos por dieta
hiperlipídica e baixas doses de
estreptozotocina**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Jenifer Saffi
Coorientador: Dr. Ramiro Barcos Nunes

Porto Alegre

2015

Catalogação na Publicação

Baldissera, Giovana

Efeitos da administração do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e do treinamento aeróbio contínuo em ratos diabéticos induzidos por dieta hiperlipídica e baixas doses de estreptozotocina / Giovana Baldissera. -- 2015.

70 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Reabilitação, 2015.

Orientador(a): Prof. Dra. Jenifer Saffi ;
coorientador(a): Dr. Ramiro Barcos Nunes.

1. Diabetes mellitus experimental. 2. *Syzygium cumini*.
3. Exercício. 4. Dano ao DNA. 5. Estresse oxidativo. I.
Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Aos meus pais, Romeu e Maria Janete, pelos ensinamentos primados pela educação que norteiam minha vida pessoal e profissional, pelo exemplo de seres-humanos e pelo suporte incondicional.

Ao meu irmão, Vinícius, pelo companheirismo, amizade, compreensão, incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof. Dra. Jenifer Saffi, pelo exemplo de profissionalismo de caráter instigador constante ao conhecimento, por todos os ensinamentos, pela oportunidade que me foi dada e pela confiança na realização deste trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Ramiro Barcos Nunes, pela maneira inspiradora e exemplar de trabalhar com a pesquisa e pela admirável tranquilidade e sempre disponível suporte que me nortearam nos momentos de maior dificuldade.

Ao Prof. Dr. Pedro Dal Lago, pela oportunidade que me foi concedida de trabalhar no seu honrado laboratório e de fazer parte de seu grupo de pesquisa e ter podido aprender tanto com este.

À Prof. Dra. Dinara Jaqueline Moura, pelo suporte científico e acadêmico em todos os momentos e pela sublime seriedade e domínio do conhecimento que inspira de maneira singular seus alunos e colegas.

Aos colegas dos grupos de pesquisa do Laboratório de Genética Toxicológica e do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, em especial à Nathália Denise de Moura Sperotto, à Helen Thais da Rosa, ao Giuseppe Potrick Stefani, à Verônica Brito, ao Jeferson Gustavo Henn, à Franciele Faccio Busatto, à Ana Moira Morás e ao Rodrigo Moisés Veríssimo, por todo auxílio prestado que foi de essencial importância na realização deste trabalho e pela amizade construída.

À Marília Zandoná, do Laboratório de Análises Clínicas da UFCSPA, pela colaboração nas leituras das análises bioquímicas.

Aos funcionários da UFCSPA responsáveis pela segurança e pela limpeza dos ambientes de trabalho.

À colega e amiga Aline Marcelino de Andrade pelo auxílio prestado como aluna de iniciação científica voluntária.

Aos amigos pelo apoio e incentivo constantes e pela paciente compreensão nos momentos de ausência.

Aos familiares que são minha força e minha base, que fizeram deste trabalho uma realidade e com os quais eu compartilho esta conquista.

RESUMO

Introdução: O diabetes mellitus é uma desordem crônica caracterizada por defeitos no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios em virtude do comprometimento na secreção e ação do hormônio insulina, apresentando manutenção crônica de níveis elevados de glicose circulante e gerando uma superprodução de superóxido mitocondrial nas células endoteliais. Em células aeróbias, os radicais livres podem causar danos severos a macromoléculas celulares, especialmente o DNA. O uso de plantas com propriedades antioxidantes e o exercício físico podem exercer influência positiva sobre os parâmetros afetados; neste contexto, a espécie *Syzygium cumini* - o popular jambolão – apresenta potencial atividade antidiabética enquanto o treinamento aeróbio pode otimizar a captação da glicose pelos tecidos. **Objetivos:** Avaliar a capacidade funcional, os parâmetros bioquímicos, o estresse oxidativo e o dano ao DNA a partir da associação de um protocolo de administração oral de extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels e de treinamento aeróbio contínuo (TAC) em esteira em ratos diabéticos (D). **Metodologia:** Trinta e sete ratos Wistar machos foram divididos em 5 grupos: Controles normoglicêmicos (CONT), diabéticos (D-CONT), diabéticos tratados com extrato (D+EBH), diabéticos treinados (D+TAC) e diabéticos tratados com extrato e treinados (D+EBH+TAC), sendo submetidos a 8 semanas de suas respectivas intervenções. Os animais foram induzidos ao diabetes com dieta hiperlipídica e baixas doses de estreptozotocina intraperitoneal, mimetizando o diabetes tipo 2. A capacidade funcional foi avaliada a partir do teste de capacidade máxima ao exercício; os parâmetros bioquímicos por kits enzimáticos; o estresse oxidativo pelas medidas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por medida do malondialdeído (MDA) e diclorofluoresceína oxidada (DCF) e o dano em DNA pelo teste cometa. **Resultados:** Os grupos D+TAC e D+EBH+TAC apresentaram melhor capacidade funcional ao final das intervenções em comparação ao grupo D-CONT e com relação ao resultado do teste inicial intragrupo. O grupo D+EBH apresentou redução da glicemia, da trigliceridemia e do índice de dano ao DNA no sangue, fígado, rim, coração, pulmão e músculo gastrocnêmio, além de aumento dos níveis de SOD no fígado, no rim e no pulmão e de CAT no rim e redução da lipoperoxidação (TBARS) nos cinco tecidos estudados, apresentando diferença significativa com relação ao grupo D-CONT. O exercício (D+TAC) foi eficaz na redução da trigliceridemia e na proteção contra o dano ao DNA no sangue e no coração, bem como na melhora dos níveis de SOD no pulmão e na redução da lipoperoxidação nos cinco tecidos estudados e da oxidação de DCF no rim. Entretanto, o efeito aditivo da associação dos protocolos de intervenção (EBH+TAC) foi observado apenas no aumento dos níveis de SOD no gastrocnêmio. **Conclusão:** Os achados neste estudo sugerem uma potencial atividade hipoglicêmica, hipolipidêmica e protetora contra o estresse oxidativo e contra o dano ao DNA do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels, provavelmente devido à sua propriedade antioxidante. Além disso, sugerem o efeito benéfico do exercício físico no diabetes sobre a melhora da capacidade funcional, no controle da trigliceridemia e na redução da lipoperoxidação. A associação dos protocolos de intervenção apresentou efeito aditivo sobre a atividade antioxidante nas células musculares.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus Experimental; *Syzygium cumini*; Exercício; Dano ao DNA; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Diabetes mellitus is a chronic disorder characterized by defects in the metabolism of carbohydrates, proteins and lipids due to impaired secretion and action of the hormone insulin, presenting chronic maintenance of high levels of circulating glucose and generating an overproduction of mitochondrial superoxide in endothelial cells. In aerobic cells, free radicals can cause severe damage to cellular macromolecules, especially DNA. The use of plants with antioxidant properties and physical exercise can have a positive influence on the affected parameters; in this context, the *Syzygium cumini* species - the popular jambolan - has potential antidiabetic activity while aerobic training can optimize the glucose uptake by the tissues. **Objectives:** To evaluate the functional capacity, biochemical parameters, oxidative stress and DNA damage from the combination of protocols which includes an oral administration of crude hydroalcoholic extract (EBH) of leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and continuous aerobic training (TAC) on a treadmill in diabetic (D) rats. **Methods:** Thirty-seven male Wistar rats were divided into 5 groups: normoglycemic controls (CONT), diabetic controls (D-CONT), diabetics treated with extract (D+EBH), trained diabetic (D+TAC) and diabetics treated with extract and trained (D+EBH+TAC) and undergo eight weeks of their respective interventions. They were induced to diabetes with high-fat diet and intraperitoneal low doses of streptozotocin, mimicking the type 2 diabetes. Functional capacity was assessed using the maximum exercise capacity test; biochemical parameters with enzymatic kits; oxidative stress by measurements of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by measuring the malondialdehyde (MDA) and oxidized dichlorofluorescein (DCF) and the DNA damage by the comet test. **Results:** The D+TAC and D+EBH+TAC groups had better functional capacity at the end of the interventions compared to the group D-CONT and with the result of intra-group initial test. The D+EBH group showed reduced glucose levels, triglycerides levels and DNA damage index in the blood, liver, kidney, heart, lung and gastrocnemius muscle, and improved SOD levels in the liver, kidney and lung, CAT levels in the kidney and lower lipid peroxidation (TBARS) in all tissues studied, with significant differences compared to D-CONT group. The exercise (D+TAC) was effective in reducing triglycerides and in the protection against DNA damage in blood and heart, as well as improved SOD levels in the lung and reducing lipid peroxidation in the five tissues studied and the DCF oxidation in the kidney. However, the additive effect of the combination of intervention protocols (EBH+TAC) was observed only in improving the gastrocnemius SOD levels. **Conclusion:** The findings in this study suggest a potential hypoglycemic, hypolipidemic and protective activities against oxidative stress and against DNA damage of *S. cumini*'s leaves hydroalcoholic crude extract, probably due to its antioxidant property. Moreover, they suggest the benefic effect of exercise on diabetes, improving the functional capacity, blood triglycerides control and decreasing lipid peroxidation. The association of intervention protocols presented an additive effect on the antioxidant activity in muscle cells.

Key-words: Experimental Diabetes Mellitus; *Syzygium cumini*; Exercise; DNA damage; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Número de pessoas com diabetes segundo as regiões da Federação Internacional de Diabetes.....	15
Figura 2 – Sensibilidade à glicose e comunicação intertecdual.....	17
Figura 3 – Representação esquemática do estresse oxidativo e das vias que levam ao diabetes tipo 2 e suas complicações.....	20
Figura 4 – Representação diagramática da relação entre ERO, enzimas antioxidantes, e peroxidação lipídica.....	23
Figura 5 – Ilustração e fotografia catalogada das folhas e frutos de <i>S. cumini</i> (L.) Skeels.....	25
Figura 6 – Esteira adaptada para ratos.....	30
Figure 1 – Biochemical parameters: tail glycemia, serum glucose, total cholesterol, triglycerides, TGO and TGP in all groups	48
Figure 2 – Antioxidant enzymes SOD and CAT measured in the liver, kidney, heart, lungs and gastrocnemius from all groups	50
Figure 3 – Lipid peroxidation measured with TBARS quantification in liver, kidney, heart, lungs and gastrocnemius in all groups.....	51
Figure 4 – Evaluation of ROS formation in liver, kidney, heart, lungs and gastrocnemius in all groups.....	52
Figure 5 – DNA damage index measured with the alkaline comet assay in blood, liver, kidney, heart, lungs and gastrocnemius in all groups	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vias enzimáticas: origem, espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e seus produtos.....	18
Tabela 2 – Usos medicinais populares da <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	26
Tabela 3 – Composição percentual dos óleos voláteis presentes nas folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels.....	27
Table 1 - Characterization of the groups: inicial and final body weight, tail blood glycemia after DM induction and after the interventions and inicial and final distance, total time and speed on maximum exercise capacity test	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> [®]
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada (do inglês <i>Advanced Glycation End-products</i>)
CAT	Catalase
CONT	Controles
D	Diabéticos
D-CONT	Diabéticos Controles
DCF	Diclorofluoresceína Oxidada
DCF-DA	Diacetato de Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorofluoresceína
DCNT	Doenças Crônicas Não-Transmissíveis
D+EBH	Diabéticos + Extrato Bruto Hidroalcoólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i>
D+EBH+TAC	Diabéticos + Extrato Bruto Hidroalcoólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i> + Treinamento Aeróbio Contínuo
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EBH	Extrato Bruto Hidroalcoólico de folhas de <i>Syzygium cumini</i>
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GLUT4	Transportador de Glicose Tipo 4 (do inglês <i>Glucose Transporter Type 4</i>)
GPx	Glutationa Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina (do inglês <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
•NO	Óxido Nítrico

O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
•OH	Radical Hidroxila
RL	Radicais Livres
<i>S. cumini</i>	<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels
SOD	Superóxido Dismutase
TAC	Treinamento Aeróbio Contínuo
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (do inglês <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO	15
2.1 Epidemiologia, fisiopatologia e alterações metabólicas no diabetes mellitus..	15
2.2 Estresse oxidativo e dano ao DNA.....	17
2.2.1 Defesas Antioxidantes.....	21
2.2.1.1 Superóxido dismutase (SOD).....	21
2.2.1.2 Catalase (CAT)	22
2.2.2 Marcadores de Estresse Oxidativo Utilizados Neste Estudo.....	22
2.2.2.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	22
2.2.2.2 Diclorofluoresceína	23
2.3 Intervenções e tratamento não farmacológico do diabetes mellitus	24
2.3.1 Extrato Bruto Hidroalcoólico de Folhas de <i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels..	24
2.3.2 Treinamento Aeróbico Contínuo	29
3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO.....	32
4 ARTIGO.....	39
5 CONCLUSÃO GERAL	65
6 PERSPECTIVAS.....	65
ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O diabetes mellitus é uma desordem metabólica multifatorial influenciada por fatores genéticos e ambientais. O diabetes mellitus tipo 1 compreende uma base genética caracterizada por destruição autoimune das células β -pancreáticas e consequente prejuízo na síntese e secreção do hormônio insulina. O diabetes mellitus tipo 2 (DM 2) envolve uma predisposição determinada por diversos genes associada a múltiplos fatores ambientais balizados pelo estilo de vida. A resistência e a concomitante redução da sensibilidade à insulina, o comprometimento da captação de glicose e um quadro de hiperglicemia crônica e dislipidemia são aspectos peculiares ao DM 2 (Berná G et al, 2014). As complicações vasculares do diabetes mellitus são importantes causas de morbimortalidade nos países desenvolvidos e constituem preocupação crescente para as autoridades de saúde em todo o mundo. A atual pandemia e o assustador cenário epidemiológico do diabetes têm estimulado pesquisas sobre sua fisiopatologia visando otimizar a eficiência na detecção, na prevenção e no tratamento das complicações associadas (Dobrota VM et al, 2014).

As intervenções não farmacológicas no tratamento do diabetes baseiam-se em mudanças no estilo de vida, particularmente em hábitos dietéticos, com enfoque nos antioxidantes naturais (Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N, 2014), e na prática orientada, adequada e regular de exercícios físicos (Lemos ET et al, 2011).

Independentemente de como e onde são gerados, um aumento nos níveis de oxidantes intracelulares tem, potencialmente, efeitos sobre danos às moléculas biológicas e ativação de vias de sinalização específicas. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio têm sido estudadas e reconhecidas como um fator importante causador de dano celular em condições patológicas, podendo ocasionar danos a macromoléculas biológicas, especialmente o DNA (Banerjee M, Vats P, 2014). Em um sistema biológico, um antioxidante é definido como qualquer substância que atrasa significativamente ou evita a oxidação de um substrato oxidável, quando presente em concentrações menores que o referido substrato (Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK, 2013). As células vivas possuem mecanismos de eliminação de radicais livres para evitar o excesso de lesão celular induzida por

espécies reativas de oxigênio, no entanto, com o envelhecimento, sob a influência de condições externas ou na presença de doenças e complicações metabólicas, esses mecanismos tornam-se ineficientes, fazendo-se necessária a intervenção no estilo de vida no que diz respeito ao uso de terapia com antioxidantes exógenos e aumento das defesas endógenas cujo principal estímulo é a prática regular de exercício físico.

As propriedades terapêuticas de plantas medicinais podem proporcionar benefícios no tratamento do diabetes por representarem uma fonte útil de compostos hipoglicêmicos tanto para a condução do desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos como para serem utilizadas como suplemento dietético coadjuvante às terapias existentes. A composição química e a propriedade antioxidante das diferentes estruturas da espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels têm sido extensamente estudadas devido à sua potencial atividade anti-hiperglicemiante, hipoglicemiante e hipolipidêmica, tendo sua utilização no tratamento do diabetes originada pela medicina tradicional na Índia (Eshwarappa RSB et al, 2014). Popularmente conhecida por jambolão, sua ação farmacológica e propriedade antioxidante dá-se em razão dos compostos fenólicos presentes nas diferentes estruturas morfológicas da planta, como flavonoides, taninos e antocianinas, além de outras substâncias como óleos essenciais, terpenoides, alcaloides e vitaminas. (Mohamed A, Ali SI, El-Baz FK, 2013).

O exercício físico, especialmente o treinamento aeróbio contínuo, é conhecido como uma intervenção não farmacológica eficaz no tratamento do diabetes por otimizar a captação e utilização da glicose nos tecidos periféricos, induzidos pelo aumento da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e da atividade de enzimas glicolíticas durante e após o exercício (Yavari A et al, 2012). Além disso, a regularidade do treinamento é capaz de induzir à melhora das defesas antioxidantes a longo prazo (Li G et al, 2014), levando à melhora da qualidade de vida e da capacidade funcional de indivíduos acometidos pelo DM 2. Na literatura científica, a maior parte dos estudos destina-se a investigar os efeitos do exercício físico sobre a glicemia e captação de glicose pelo músculo esquelético, entretanto, o treinamento físico é capaz de proporcionar adaptações fisiológicas que levam a otimização do metabolismo energético de todos os tecidos do corpo (Nikolaidis MG et al, 2012).

Diante do supracitado, o objetivo do presente estudo foi estudar os efeitos da administração do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *Syzygium cumini* e do treinamento aeróbico contínuo sobre a capacidade funcional, os parâmetros bioquímicos, o estresse oxidativo e o dano ao DNA no sangue, fígado, rim, coração, pulmão e músculo gastrocnêmio de ratos com DM2 induzido por dieta hiperlipídica e baixas doses de estreptozotocina. Embora possam ser encontrados na literatura estudos que apresentam os efeitos dessas intervenções de forma isolada (Rodrigues B et al, 2007; Schoenfelder T et al, 2010; Nascimento OS et al, 2012), ainda não foram analisados, até o presente momento, os efeitos destas intervenções combinadas. Portanto, a hipótese do estudo baseia-se na ideia de que a associação das intervenções promova resultados mais expressivos em razão do possível efeito aditivo, apresentando melhora da capacidade funcional, dos parâmetros bioquímicos, reduzindo o estresse oxidativo e o índice de dano ao DNA no sangue e em diferentes tecidos de ratos diabéticos submetidos às intervenções. Dessa forma, o presente trabalho buscou investigar, no modelo experimental, uma nova estratégia para reverter os prejuízos promovidos pelo DM2, contribuindo para o entendimento e otimização das abordagens terapêuticas, melhorando os aspectos relacionados à fisiopatologia do diabetes.

2 REVISÃO DE LITERATURA – CONTEXTUALIZAÇÃO

2.1 EPIDEMIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO DIABETES MELLITUS

O diabetes caracteriza-se por ser um crescente problema de saúde mundial, uma vez que sua prevalência continua a aumentar globalmente e traz um aumento paralelo de complicações associadas à doença cardiovascular, sendo esta a mais importante complicação a longo prazo e a maior causa de morte em pessoas com a doença (ADA, 2002; Pu LJ et al, 2006). Estima-se que cerca de 382 (8,3% da população adulta) milhões de pessoas do mundo sejam diabéticas e que cerca de 46% da população mundial ainda não seja diagnosticada (Figura 1). Em 2035, conjectura-se um aumento de 55% na prevalência da doença, atingindo 592 milhões de casos. Tal realidade implica em elevados gastos com a saúde e, conseqüentemente, em impacto social, humano e econômico sobre os países em diferentes níveis de renda (IDF, 2013), uma vez que as complicações associadas ao diabetes englobam distúrbios vasculares e sistêmicos como disfunção endotelial, inflamação, trombose, estresse oxidativo e dislipidemia (Stratmann B, Tschoepe D, 2011).

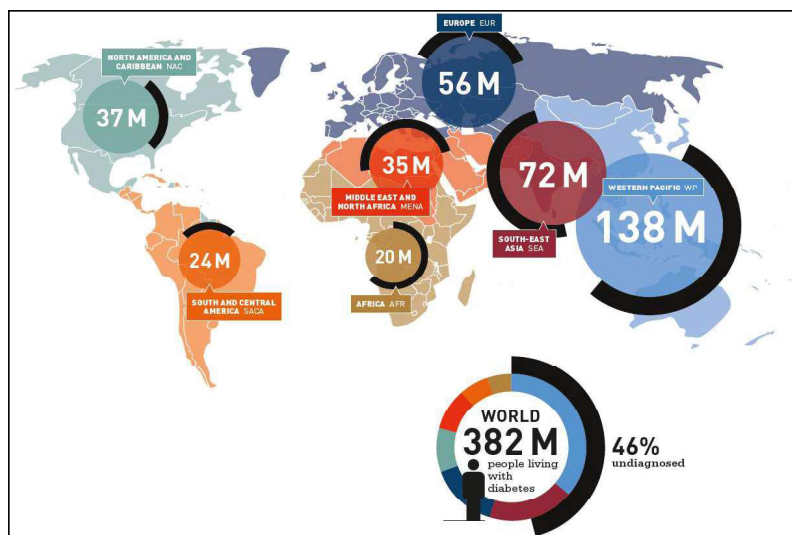


Figura 1. Número de pessoas com diabetes segundo as regiões da Federação Internacional de Diabetes. (IDF, 2013).

Do total de casos, o diabetes do tipo 2 (DM2) é o mais prevalente e a interação entre fatores genéticos e ambientais contribuem para uma complexa associação de ricos de desenvolvimento desta doença crônica não transmissível, a qual é considerada uma desordem metabólica caracterizada por um estado de hiperglicemia crônica associada a danos de longo prazo, como comprometimento micro e macrovascular, disfunção e falência da atividade de órgãos, especialmente os olhos (retinopatia), rins (nefropatia), nervos (neuropatia), coração e vasos sanguíneos (Dobrota VM et al, 2014; Karalliedde J, Gnudi L, 2014).

A insulina é um hormônio anabólico produzido pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas em resposta a alterações nos níveis plasmáticos de nutrientes, em especial a glicose. Em condições normais, ao ser secretada a insulina se liga a receptores inseridos na membrana das células insulino-dependentes. A base das anormalidades no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras é a ação deficiente de insulina nos tecidos-alvo, a qual é resultado da secreção inadequada de insulina e/ou da diminuição da resposta à insulina nos tecidos-alvo, ou seja, a resistência à insulina (ADA, 2002; Berná G et al, 2014), cujo mecanismo envolve perda da capacidade dos tecidos de adaptarem-se a alterações metabólicas, comprometendo a homeostase da glicose, a qual depende da interação das respostas dos tecidos em diferentes situações, como no jejum, no estado alimentado ou durante o exercício (Herman MA, Kahn BB, 2006). A glicose é detectada em vários tecidos e tipos de células, incluindo o hipotálamo, células pancreáticas, hepatócitos, músculo esquelético e tecido adiposo, com cada um dos quais se comunica via sinalização hormonal, neural, ou por *feedback* em resposta a alterações na utilização do substrato (Figura 2). A hiperglicemia crônica exerce efeitos degenerativos sobre os vasos sanguíneos, os quais culminam com a morte dos tecidos e órgãos envolvidos, principalmente devido ao recrutamento de monócitos do sangue periférico para a camada íntima da parede dos vasos e sua diferenciação em macrófagos, evento característico na aterogênese (Chen T-C et al, 2014). Indivíduos adultos com DM2 têm um risco aumentado de incidência de complicações macrovasculares (Ohsugi K et al, 2013), como disfunção endotelial (desequilíbrio na produção endotelial de mediadores que regulam o tônus vascular, agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise), levando à aterosclerose cardiovascular, doença arterial periférica e doenças cerebrovasculares, além de

hipertensão e anormalidades no metabolismo das lipoproteínas (Matkovics A, 2003; Stratmann B, Tschoepe D, 2011; Bello NA et al, 2014).

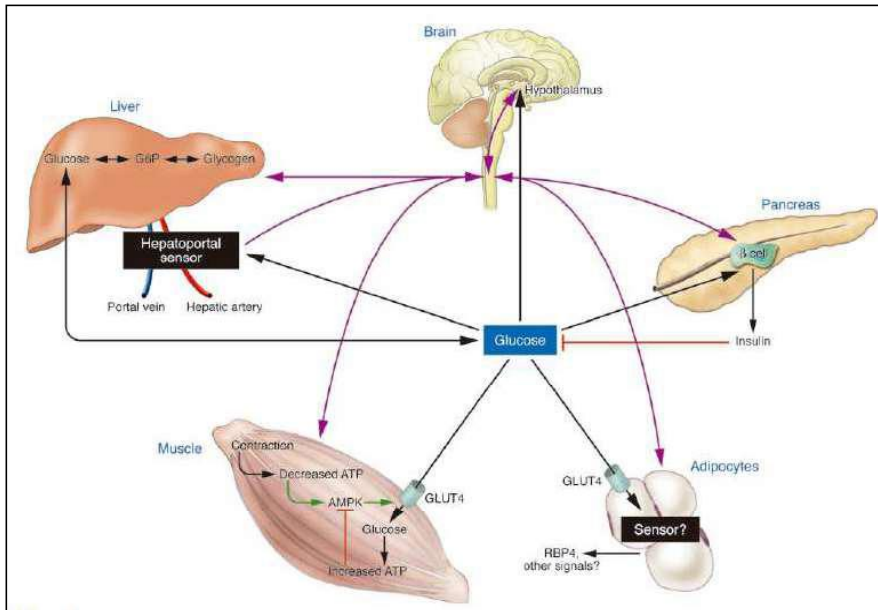


Figura 2. Sensibilidade à glicose e comunicação intercelular. As linhas em cor rosa representam comunicação mediada via sistema neural. As linhas pretas representam comunicação mediada por níveis de glicose ou por hormônios. (Adaptado de Herman e Kahn, 2006).

Tais complicações resultam em mortalidade quando não diagnosticadas e tratadas, bem como levam a um aumento da morbidade, como comprometimento da capacidade funcional e da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DANO AO DNA

O estresse oxidativo é caracterizado por uma instabilidade no estado redox, ou seja, um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), gerando radicais livres (RL) principalmente via cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Arcaro CA et al, 2014) e as defesas

antioxidantes endógenas (sistema enzimático: superóxido dismutase e catalase, por exemplo) e exógenas (vitaminas A, C e E, por exemplo). A definição atual de estresse oxidativo designa dois resultados mecanicistas diferentes: danos macromoleculares e comprometimento do sistema redox, os quais levam à sinalização celular desordenada e ao prejuízo no controle redox. No que se refere ao mecanismo oxidativo, os danos macromoleculares são relacionados a espécies reativas (Nikolaidis MG et al, 2012). As ERO são átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa, sendo caracterizadas por elevadas instabilidade e reatividade pois tendem a ligar o elétron não-pareado com outros em estruturas próximas de sua formação, podendo interagir como oxidantes/receptores ou redutores/doadores de elétrons. Exemplos de ERO são os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e hidroxila ($\cdot OH$), radical alquila (L^{\cdot}), alcóxila (LO^{\cdot}) e peróxila (LOO^{\cdot}) e exemplos de ERN são o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), o óxido nítrico ($\cdot NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) (Lima ES, Abdalla DSP, 2001) (Tabela 1).

Tabela 1. Vias enzimáticas: origem, espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e seus produtos. (Adaptado de Banerjee M, Vats P, 2014).

Origem – Localização da via mitocondrial	Potentes ERO e ERN oxidantes	Produtos – lipídeos e proteínas oxidados
Cadeia respiratória mitocondrial	$O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$	Lipídeos, proteínas, ácidos nucleicos oxidados e auto-oxidação por produtos.
NAD(P)H oxidase de membrana de macrófagos inflamatórios	$O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, H_2O_2	Produtos avançados de oxidação lipídica Ortho o-tirosina, Meta m-tirosina
Mieloperoxidase granular	$HOCl$ Tir $\cdot NO_2^{\cdot}$	3-clorotirosina ditirosina $\cdot NO_2^{\cdot}$ tirosina (nitrotirosina)
Óxido nítrico sintase de macrófagos	$ONOO^{\cdot}$	$\cdot NO_2^{\cdot}$ tirosina (nitrotirosina)
Óxido nítrico sintase (NOS) e óxido nítrico sintase constitutiva (cNOS)	eNOS $\rightarrow \cdot NO$ nNOS $\rightarrow \cdot NO$ $\cdot NO + O_2^{\cdot-} \rightarrow ONOO^{\cdot}$	$\cdot NO_2^{\cdot}$ tirosina (nitrotirosina)

Altos níveis de radicais livres estão relacionados com doenças crônicas não-transmissíveis (DCNT), aterosclerose, câncer, doenças hepáticas e envelhecimento. O estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão das complicações relacionadas ao DM2, uma vez que as ERO também atuam como fatores que ativam vias intracelulares de

sinalização relacionadas à hiperglicemia, as quais estão envolvidas na patogênese das complicações crônicas.

A auto-oxidação da glicose envolve redução espontânea de oxigênio molecular a superóxido e radical hidroxila, os quais são altamente reativos e capazes de interagir com diversas biomoléculas. Além disso, tais produtos aceleram a formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), a via dos polióis, o aumento do fluxo da hexosamina e comprometem a síntese e a ação das defesas antioxidantes, levando às complicações relacionadas ao DM2 (Baliga MS et al, 2013; Arcaro CA et al, 2014). Os efeitos patológicos dos AGEs estão relacionados à capacidade destes em modificar as propriedades químicas e funcionais de estruturas biológicas. Sua auto-oxidação gera ERO, estando envolvidos nas complicações macro e microvasculares do DM2. Por gerarem radicais livres, por formarem ligações cruzadas com proteínas ou por interagirem com receptores celulares, os AGEs promovem estresse oxidativo, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores e marcadores inflamatórios (Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara TJ, 2008). O aumento do fluxo pela via dos polióis leva a uma maior conversão de glicose a sorbitol, uma vez que a hiperglicemia reduz os níveis de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) (Reis JS et al, 2008), ativando a aldose redutase, consequentemente reduzindo NADPH e o antioxidante intracelular glutatona. Quando reduzidos os níveis do óxido nítrico, ocorre vasoconstrição; já quando este é inibido, sucede-se a ativação de mastócitos, os quais contribuem para a disfunção endotelial devido ao aumento da permeabilidade vascular (Vicentim AL, Marcellino MCL, 2012).

No quadro hiperglicêmico, ocorre uma superprodução de superóxido mitocondrial, sendo as células endoteliais os principais alvos de danos oxidativos induzidos pela glicose nos órgãos-alvo. Em células aeróbias, os radicais livres podem causar danos severos a biomoléculas, à membrana celular, a paredes dos vasos, a proteínas, a lipídios e, especialmente, ao DNA (Taş S, Sarandöl E, Dirican M, 2014). Em se tratando de danos ao DNA causados por um quadro de estresse oxidativo, há ativação de enzimas de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos (Feng B, Ruiz MA, Chakrabarti S, 2013). Caso a cadeia do DNA seja quebrada, esta pode ser reconectada em outra posição, alterando, assim, a ordem de suas bases. Esse é um dos processos básicos da mutação e o acúmulo de bases danificadas pode desencadear a oncogênese. Uma enzima que tenha seus aminoácidos

alterados pode perder sua atividade ou, ainda, assumir atividade diferente da qual é geneticamente programada para assumir (Barreiros ALBS, David JM, David JP, 2006).

Além das alterações fisiológicas supracitadas originando comportamentos celulares e moleculares patológicos, há ainda o fato de que os radicais livres possuem a propriedade de reagir com os ácidos graxos poli-insaturados, atuando como desencadeadores do processo de lipoperoxidação (LPO) ou peroxidação lipídica (Lima ES, Abdalla DSP, 2001) (Figura 3). A LPO é um evento citotóxico cuja consequência é a geração de uma série de lesões à membrana celular, causando alterações da permeabilidade, ou seja, ocorre uma modificação do fluxo que resulta na perda da seletividade para a entrada e a saída tanto de nutrientes quanto de substâncias tóxicas à célula, levando a alterações no DNA e comprometimento da troca entre os componentes da matriz extra e intracelular.

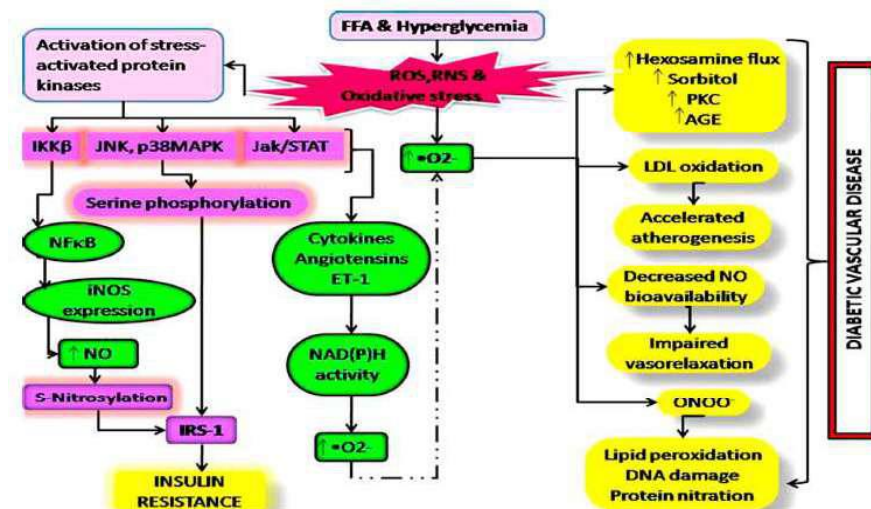


Figura 3. Representação esquemática do estresse oxidativo e das vias que levam ao diabetes tipo 2 e suas complicações. Espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e estresse oxidativo induzido por elevados níveis circulantes de glicose e ácidos graxos livres (FFA) desempenham um papel fundamental na origem da resistência à insulina e disfunção das células β-pancreáticas, ativando vias de sinalização sensíveis ao estresse. As sequências dos eventos propostas incluem outras vias, tais como o aumento da produção de produtos finais de glicação avançada (AGE), a via do sorbitol, citocinas, e hexosaminas. As ERO e as ERN desempenham um papel fundamental na patogênese do diabetes por levar a danos macromoleculares. (Banerjee M, Vats P, 2014).

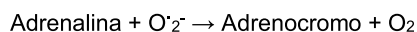
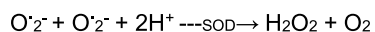
Em estudo que avaliou o potencial genotóxico de ERO, LPO e enzimas de reparo do DNA em ratos diabéticos (Yaduvanshi SK et al, 2012), foi observado, pela análise do teste cometa, um aumento significativo de quebras no DNA em linfócitos de ratos diabéticos, bem como um aumento dos níveis de ERO e do marcador de LPO, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o que sugere o envolvimento do estresse oxidativo nos danos ao DNA induzidos por ERO.

2.2.1 Defesas Antioxidantes

2.2.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi descrita pela primeira vez por McCord e Fridovich (1969). Uma vez formado, o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é dismutado enzimaticamente a H_2O_2 e oxigênio (O_2) pela família de enzimas antioxidantes SOD, a qual inclui as enzimas intracelular ou citosólica (Cu Zn-SOD, produto do gene SOD1), mitocondrial (Mn-SOD, produto do gene SOD2) e extracelular (EC-SOD, produto do gene SOD3) [Delbin MA et al, 2012, Banerjee M, Vats P, 2014].

A técnica utilizada para a determinação da SOD é baseada na inibição do $O_2^{\cdot-}$ com a adrenalina, uma vez que a SOD presente na amostra compete pelo $O_2^{\cdot-}$. A catalase é utilizada para estabilizar a reação, não permitindo que o H_2O_2 oxide a adrenalina. A concentração da enzima não pode ser determinada tampouco sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, portanto, utiliza-se a quantificação da enzima em unidades relativas. Uma unidade da SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe 50% da velocidade de oxidação da adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação do adrenocromo, detectado espectrofotometricamente.



O H_2O_2 gerado pelas SOD é convertido em água e oxigênio pela catalase (Figura 4).

2.2.1.2 Catalase (CAT)

A CAT está presente no citosol e, principalmente, nos peroxissomas, no entanto, nem todos órgãos os possuem, estando, portanto, mais expostos aos danos provocados pela produção de ERO, como, por exemplo, coração e pulmões, e seu mecanismo de defesa pode ser a difusão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para o sangue, onde reage com a CAT eritrocitária. Nos seres humanos, a CAT é uma hemoproteína altamente específica e possui atividade apenas para o H_2O_2 , catalisando sua decomposição a água e oxigênio (Figura 4).

2.2.2 Marcadores de Estresse Oxidativo Utilizados Neste Estudo

2.2.2.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Quando ocorre quebra de lipídios, sempre são produzidos aldeídos, cujo interesse em identifica-los e medi-los está na capacidade de mensuração do índice da extensão da LPO e na possibilidade que tal medida representa para elucidar o papel de aldeídos como agentes causadores de determinadas condições patológicas. Para avaliar a LPO, uma das técnicas mais utilizadas é o teste do malondialdeído (MDA), o qual é o aldeído mais abundante originado como um produto secundário resultante da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (Figura 4).

Em meio ácido e em alta temperatura, reage eficientemente com agentes nucleofílicos e sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) forma produtos que podem ser determinados por absorção (Lima ES, Abdalla DSP, 2001). O teste consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBA, no qual se utiliza como padrão o MDA obtido pela hidrólise do tetrametoxipropano ou tetraetoxipropano (Yu LW et al, 1986).

2.3 INTERVENÇÕES E TRATAMENTO NÃO FARMACOLÓGICO DO DIABETES MELLITUS

O objetivo imediato no tratamento do DM2 é baixar os altos níveis de glicose sanguínea. Fatores ambientais e estilo de vida são, em grande parte, modificáveis e, portanto, representam um alvo de prevenção e tratamento para o DM2 (Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N, 2014). Antes da intervenção farmacológica, o tratamento mais significativo para o DM2 é a modificação do estilo de vida no que diz respeito ao controle dietético e a prática de exercício físico regular.

2.3.1 Extrato Bruto Hidroalcoólico de Folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels

Substâncias com potencial antidiabético são utilizadas popularmente, principalmente quando provêm de fontes vegetais. Um exemplo é a *Syzygium cumini* (L.) Skeels, da família das Myrtaceae, popularmente conhecida como jambolão, que tem sido extensamente estudada como um agente antidiabético, sendo frequentemente utilizada como um adjuvante no tratamento do DM2, tendo como origem a medicina popular indiana (Helmstädter A, 2008; Dusane MB, Joshi BN, 2011; Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012).

A espécie *S. cumini* é uma árvore nativa da região tropical no sul da Ásia, particularmente da Índia, Tailândia, Filipinas e Indonésia (norte da Oceania). No Brasil, a planta é encontrada em diversos estados das regiões sudeste, sul, nordeste e norte (Migliato KF et al, 2006). A árvore da espécie é de grande porte (10 metros de altura), com folhas simples e alongadas, frutos cor roxo–escura com uma única semente coberta de polpa comestível, mucilaginoso, doce e adstringente (Figura 4). Algumas sinonímias científicas da espécie *S. cumini* são *Syzygium jambolanum* (Lam.) DC, *Syzygium jambolana* DC., *Syzygium jambolanum* DC., *Eugenia jambolana* Lam., *Eugenia cumini* (L.) Druce, *Myrtus cumini* Linn.. (Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012; Soares JJ, 2013) e, no Brasil, é popularmente conhecida como jambolão, jamelão, jambo, baguaçu, João-bolão, azeitona-preta, baga-de-freira, brinco-de-viúva ou guapê.

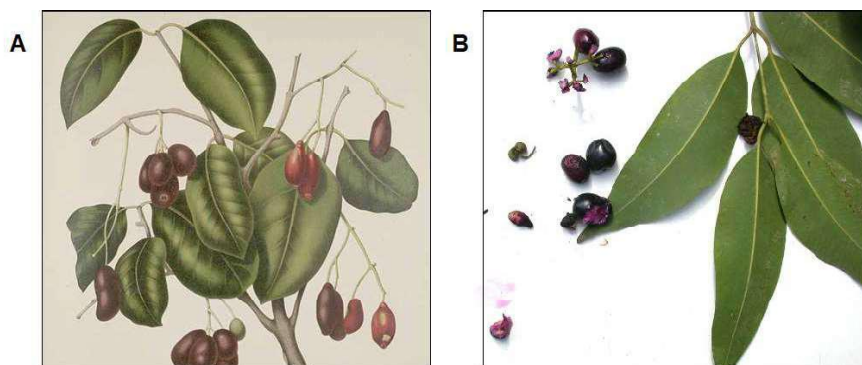


Figura 5. Ilustração (A) e fotografia catalogada (B) da folhas e frutos de *S. cumini* (L.) Skeels. (Adaptados de Hoola van Nooten B, 1880 e Hawthorn WD, *The Virtual Field Herbarium*).

A casca da árvore, os frutos, as sementes e as folhas da planta são popularmente utilizados no tratamento do DM2 e administrados em diferentes formas de preparação (extrato aquoso ou decocção, extrato hidroalcoólico, chás, sucos, *in natura* etc.) (Tabela 2). A potencial propriedade antidiabética da planta tem sido estudada desde as décadas de 1960 e 1970, nas quais foram publicados registros científicos da investigação de seus efeitos em animais diabéticos, entretanto, as propriedades das diferentes estruturas da espécie são caracterizadas pelas atividades: antioxidante, antimicrobiana, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antifúngica, diurética e antidiarreica (Ruan ZP, Zhang LL, Lin YM, 2008; Gowri SS, Vasantha K, 2010; Kaneria M, Chanda S, 2011; Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012; Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK, 2013). Além disso, estudos em humanos, experimentais e *in vitro* sugerem uma potencial atividade hipoglicemiante do extrato de folhas de *S. cumini* (Bopp A et al, 2009; Schoenfelder T et al, 2010), além de efeitos hipolipidêmicos, antioxidantes e protetores do DNA (Jagetia GC, Baliga MS, 2002; Bartolome A et al, 2006; Schoenfelder T et al, 2010; De Bona KS et al, 2011).

Apesar dos efeitos benéficos dos extratos das folhas de *S. cumini* sobre parâmetros bioquímicos *in vivo* e capacidade antioxidante *in vitro* estarem bem documentadas, na literatura científica há poucos estudos que investigam, avaliam e mesuram a atividade antioxidante desses extratos em modelos *in vivo*.

Tabela 2. Usos medicinais populares da *Syzygium cumini* (L.) Skeels. (Adaptado de Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012).

Grupo étnico usuário e suas origens	Parte da planta usada, modo de preparo, administração e doenças tratadas
População local do Sul do Brasil	Tanto infusões quanto decocções das folhas do jabolão em água numa concentração média de 2,5 g/L, ingeridas no lugar da água com consumo diário médio de 1 litro, são usadas no tratamento do diabetes.
Lakher e Pawi, nordeste da Índia	A infusão do fruto ou mistura da casca em pó e frutos é administrada por via oral para o tratamento do diabetes. O suco obtido a partir das sementes é aplicado externamente em feridas e úlceras. Sementes em pó são misturadas com açúcar e administradas via oral 2 a 3 vezes ao dia para o tratamento da disenteria. O suco das folhas é administrado por via oral como antídoto na intoxicação por ópio e na ocorrência de mordida por centopeia. O suco dos frutos maduros é armazenado durante 3 dias e em seguida é administrado por via oral para problemas gástricos. O suco obtido a partir da casca é administrado por via oral para o tratamento de mulheres com histórico de aborto repetido.
Informantes locais em Maharastra, Índia	O fruto e a casca do caule são utilizados no tratamento do diabetes, disenteria, aumento do apetite e para o alívio da dor de cabeça.
Nepaleses, Leptchas e Buthias, nordeste da Índia	A decocção da casca do caule é administrada por via oral, 3 vezes ao dia durante 2 a 3 semanas para o tratamento do diabetes.
Ameríndios nativos e Quilombolas, oriente norte do Brasil	As folhas são usadas no tratamento do diabetes e de problemas renais.
Tribais Kani no sul da Índia	2 colheres de chá do suco extraído da folha são misturadas com mel ou leite de vaca e tomado via oral 2 vezes por dia após as refeições por 3 meses para o tratamento do diabetes. Os frutos frescos também são consumidos por via oral para o alívio da dor de estômago e para o tratamento do diabetes. As folhas novas são moídas com leite de cabra formando uma pasta ingerida via oral para tratar a indigestão.
Malayalis no sul da Índia	Uma pasta das sementes é preparada com a combinação de folhas de <i>Mormodica charantia</i> e flores de <i>Cassia auriculata</i> e consumida via oral 1 vez por dia, durante 3 meses, para o tratamento do diabetes.
Médicos curandeiros tradicionais em Madagascar	As sementes são consumidas via oral por gerações como o principal fator de uma terapia eficaz para neutralizar os impactos lentamente debilitantes do diabetes.
População local em Andhra Pradesh, Índia	As sementes secas na sombra são transformadas em pó e ingeridas via oral, 3 vezes por dia no tratamento do diabetes.
Siddis em Karnataka, Índia	O suco obtido a partir das folhas é misturado com leite e ingerido via oral no início da manhã, para tratar o diabetes.

População rural no Brasil	O suco obtido a partir da casca do caule é misturado com leite de manteiga (leitelho) e ingerido via oral todos os dias antes de ir para a cama para tratar a constipação. A mesma receita, quando consumida no início da manhã com o estômago vazio, é usada para parar e eliminação de sangue nas fezes.
Curandeiros tradicionais no Brasil	As folhas do jambolão são ingeridas via oral no tratamento do diabetes.
Tribais em Maharashtra	O chá preparado a partir da infusão ou decocção das folhas é consumido via oral para tratar o diabetes.
	As folhas tenras são consumidas via oral para tratar a icterícia. Foi constatado que olhos, unhas e urina ficaram amarelos. O tratamento foi seguido por 2 a 3 dias por adultos e por crianças.

2.3.1.1 Composição fitoquímica e ação farmacológica das folhas da espécie *Syzygium cumini* (L.) Skeels

A espécie apresenta constituintes químicos diversos e seus compostos apresentam variabilidade nas suas diferentes estruturas. As folhas do jambolão possuem 82% do total de óleos essenciais presentes na planta, além de ácido gálico e seu derivado metilgalato, canferol, miricetina, ácido elágico, ácido clorogênico, quercetina, rutina, nilocitina, antocianinas e taninos (Migliato KF et al, 2006; Reynertson KA et al, 2008; Ayyanar M, Subash-Babu P, 2012), óleos voláteis (Tabela 3), compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, capturando radicais livres e protegendo as enzimas antioxidantes celulares.

Tabela 3. Composição percentual dos óleos voláteis presentes nas folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. (Adaptado de Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK, 2013).

No.	Name of constituents	RT	Leaves oil (%)	No.	Name of constituents	RT	Leaves oil (%)
1	α -Pinene	6.32	32.32	29	α - Caryophyllene	21.56	4.36
2	Camphene	7.69	0.68	30	α -Murolene	22.16	0.69
3	β - Pinene	7.96	12.44	31	Valencene	22.58	0.22
4	β - Myrcene	9.06	1.60	32	Eremophilene	22.62	0.33
5	1-Phellandrene	9.60	0.06	33	α -Selinene	22.79	0.32
6	(+)-2-Carene	9.68	0.22	34	γ -Cadinene	23.07	0.16
7	α -Limonene	9.57	3.42	35	δ -Cadinene	23.11	0.68
8	Cinene	9.94	0.79	36	Cadina-1,4-Diene	23.57	0.05
9	1,3,6-octatriene	10.02	8.41	37	Aromadendrene	23.79	0.07
10	Delta-3-Carene	10.50	5.55	38	β -Caryophyllene epoxide	24.22	0.30
11	β -Ocimene Y	11.18	0.22	39	Caryophyllene oxide	24.57	2.91
12	Trans-beta- Ocimene	11.19	1.32	40	Globulol	25.17	0.07
13	α -Terpinolene	12.19	0.89	41	Camphene	25.24	0.40
14	Alloocimene	13.38	0.78	42	3-Cyclohexen-1-carboxaldehyde,3,4-dimethyl-	25.48	0.98
15	2,6-Dimethyl-2,4,6-octatrien	13.55	0.43	43	β -Guaiene	25.86	0.36
16	2-Chlorocamphane	14.84	0.09	44	γ -Gurjunene	26.07	0.21
17	Borneol	15.05	0.16	45	α -Amorphene	26.26	0.57
18	4-Terpineol	15.20	0.25	46	Viridiflorol	26.55	0.59
19	α -Terpineol	15.47	0.25	47	Isoaromadendrene-(V)	26.73	0.36
20	β -Fenchyl Alcohol	15.51	2.12	48	Eudesma-4(14),11-diene	27.03	0.19
21	Levo-brunyl-acetate	18.02	0.35	49	Pyridine,4-butyl-1-oxide	30.58	0.13
22	Ylangene	19.76	0.07		Total identified compounds	-	98.28
23	α -Copaene	19.83	0.29				
24	Isocaryophyllene	20.32	0.04				
25	Trans-Caryophyllene	20.36	11.19				
26	α - Ylangene	21.23	0.19				
27	(+)-Aromadendrene	21.39	0.08				
28	(+)-3-Carene,2-acetylmethyl-	21.51	0.12				

RT: Retention time.

2.3.2 Treinamento Aeróbico Contínuo

Por ser um fator determinante do gasto de energia, o exercício físico regular é fundamental para o equilíbrio do balanço energético no organismo e controle de peso (WHO, 2011). Exercícios aeróbios como caminhada, corrida, natação ou exercício em bicicleta ergométrica, realizados de maneira contínua e com intensidade e duração bem definidas, são amplamente utilizados tanto em programas de reabilitação quanto em estudos clínicos (Zdrengeha D et al, 2009; Bouchla A, 2009; Nascimento OS et al, 2012). Estudos já demonstraram os efeitos benéficos do exercício físico para o paciente diabético, influenciando direta e positivamente na melhora do controle glicêmico tanto durante quanto após o exercício (De Angelis KL et al, 2002; Rossi DM, Valenti VE, Navega MT, 2011).

O transporte de glicose para dentro das células é um fator determinante na velocidade de utilização de glicose no músculo, estimulado pela insulina. O quadro clínico de resistência à insulina observado no DM2 é manifestado por um decréscimo no transporte de glicose estimulado por insulina e por um prejuízo do metabolismo nos adipócitos e no tecido muscular, resultando na redução da resposta à insulina pelos transportadores presentes nestes tecidos. Desta forma, tal regulação não é determinada ou limitada apenas pela sensibilidade ou resistência à insulina secretada pelas células β -pancreáticas, visto que o tecido muscular participa da alteração no fluxo de utilização da glicose, contribuindo para a sua homeostase (Herman MA, Kehn BB, 2006). Os transportadores de glicose são proteínas de membrana que controlam a entrada de glicose nos tecidos, com expressão e regulação tecido-específicas. O transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) é expresso predominantemente nos tecidos muscular e cardíaco e no tecido adiposo, cujo estímulo pela insulina causa um aumento do fluxo de glicose para dentro da célula. Estudos demonstram que o exercício aeróbio aumenta a translocação de GLUT4 nas células musculares, bem como atividade de enzimas glicolíticas como a hexoquinase (responsável pela primeira reação no processo de glicólise: a fosforilação da glicose a glicose-6-fosfato) (Cauza E et al, 2005; Yavari A et al, 2012). A captação da glicose permanece elevada por até 120 minutos após o exercício físico devido ao aumento da translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) presente nas membranas plasmáticas e nos túbulos T musculares

(Venkatasamy VV et al, 2013) e do consumo de glicose pelo músculo esquelético como consequência da demanda pelo tecido durante e após uma sessão de exercício.

Dessa forma, o exercício físico pode ser considerado um importante fator de intervenção para a mudança do estilo de vida que contribui para o controle dos níveis de glicose sanguínea.

Os benefícios da prática regular e adequada de exercícios físicos, especialmente o aeróbio, encontram-se bem documentados na literatura científica, apresentando efeitos positivos tais como a redução do risco de desenvolvimento da doença cardiovascular, melhorias no tratamento a alguns tipos de câncer, diabetes e osteoporose (Khan KM et al, 2012; Venkatasamy VV et al, 2013) por aprimorar a aptidão cardiorrespiratória, consequentemente melhorando a qualidade de vida e a capacidade funcional. Em contrapartida, o exercício intenso pode causar várias lesões dos tecidos devido à produção excessiva de radicais livres e EROs (Kan NW et al, 2013). Sessões únicas de exercício aeróbio são capazes induzir a um estado agudo de estresse oxidativo, resultado de um aumento na quantidade de moléculas oxidadas em diversos tecidos, no entanto, este mecanismo parece ser necessário para induzir o aumento da regulação endógena das defesas antioxidantes a longo prazo (Fisher-Wellman K, Bloomer RJ, 2009; Nikolaidis MG et al, 2012).

Uma das alternativas para realizar o treinamento aeróbio contínuo no modelo experimental é o exercício em esteira adaptada para ratos, no qual os animais correm em velocidade e grau de inclinação pré-determinados (Figura 5).



Figura 6. Esteira adaptada para ratos.

Com base nas observações supracitadas, o presente estudo foi realizado a fim de investigar os efeitos da administração do extrato das folhas de *S. cumini* e do treinamento aeróbico contínuo sobre a capacidade funcional, os parâmetros bioquímicos, o estresse oxidativo e o dano ao DNA no sangue, no fígado, no rim, no coração, no pulmão e no gastrocnêmio de ratos diabéticos.

3 REFERÊNCIAS DA REVISÃO

- 1 Berná G, Oliveras-López MJ, Jurado-Ruiz E, Tejedo J, Bedoya F, Soria B et al. Nutrigenetics and nutrigenomics insights into diabetes etiopathogenesis. *Nutrients* 2014; 6:5338-69.
- 2 Dobrota VM, Hrabac P, Skegro D, Smiljanic R, Dobrota S, Prkacin I et al. The impact of neuropathic pain and other comorbidities on the quality of life in patients with diabetes. *Health and Quality of Life Outcomes* 2014; 12:171.
- 3 Georgoulis M, Kontogianni MD, Yiannakouris N. Mediterranean diet and diabetes: prevention and treatment. *Nutrients* 2014; 6:1406-23.
- 4 Lemos ET, Pinto R, Oliveira J, Garrido P, Sereno J, Mascarenhas-Melo F et al. Differential effects of acute (extenuating) and chronic (training) exercise on inflammation and oxidative stress status in an animal model of type 2 diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*, 2011; 1-8.
- 5 Banerjee M, Vats P. Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus. *Redox Biology* 2 2014; 170–7.
- 6 Mohamed AA, Ali SI, El-Baz FK. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS ONE* 2013; 8(4):1-7.
- 7 Eshwarappa RSB, Iyer RS, Subbaramaiah SR, Richard SA, Dhananjaya BL. Antioxidant activity of *Syzygium cumini* leaf gall extracts. *BioImpacts* 2014; 4(2):101-7.
- 8 Yavari A, Najafipour F, Aliasgarzadeh A, Niafar M, Mobasser M. Effect of aerobic exercise, resistance training or combined training in glycaemic control and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Biol. Sport* 2012; 29:135-43.
- 9 Li G, Liu J, Zhang H, Li Q, Zhang S. Exercise training attenuates sympathetic activation and oxidative stress in diet-induced obesity. *Physiol Res*. 2014.
- 10 Nikolaidis MG, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou AA, Vrabas IS. Redox biology of exercise: an integrative and comparative consideration of some overlooked issues. *The Journal of Experimental Biology* 2012; 215:1615-25.

Formatado: Português (Brasil)

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

11 Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren MV, Irigoyen MC, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovascular Diabetology* 2007; 6(38):1-7.

Formatado: Português (Brasil)

12 Schoenfelder T, Warmlin CZ, Manfredini MS, Pavei LL, Réus JV, Tristão TC, Fernandes MS et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of leaves from *Syzygium cumini* (L.) Skeels, Myrtaceae. in diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2010; 20(2):222-7.

13 Nascimento OS, Lovatel GA, Ilha J, Xavier LL, Schaan BD, Achaval M. Exercise alleviates hypoalgesia and increases the level of calcitonin gene-related peptide in the dorsal horn of the spinal cord of diabetic rats. *Clinics* 2012; 67(9):1087-91.

14 Pu LJ, Lu L, Xu XW, Zhang RY, Zhang Q, Zhang JS et al. Value of serum glycated albumin and high-sensitivity C-reactive protein level in the prediction of presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2006; 5(27):1-7.

15 American Diabetes Association (ADA). Diabetes mellitus and exercise. *Diabetes Care* 2002; 25(1):564-8.

Formatado: Português (Brasil)

16 International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th ed.; International Diabetes Federation: Brussels, Belgium, 2013.

17 Stratmann B, Tschoepe D. The diabetic heart: sweet, fatty and stressed. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 2011; 9(9):1093–96.

18 Karalliedde J, Gnudi L. Diabetes mellitus, a complex and heterogeneous disease, and the role of insulin resistance as a determinant of diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 0:1–8.

19 Herman MA, Kahn BB. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:1767–75.

20 Chen T-C, Sung M-L, Kuo H-C, Chien S-J, Yen C-K, Chen C-N. Differential regulation of human aortic smooth muscle cell proliferation by monocyte-derived macrophages from diabetic patients. *PLoS ONE* 2014; 9(11):1-8.

21 Ohsugi K, Sugawara H, Ebina K, Shiga K, Kikuchi N, Mori M et al. Comparison of brachial artery flow-mediated dilatation in youth with type 1 and type 2 diabetes. *J Diabetes Invest* 2014; 5(5):615-20.

22 Matkovics A. An overview of free radical research. *Acta Biologica Szegediensis* 2003; 47(1-4):93-7.

23 Bello NA, Pfeffer MA, Skali H, McGill JB, Rossert J, Olson KA et al. Retinopathy and clinical outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus, chronic kidney disease, and anemia. *BMJ Open Diabetes Research and Care* 2014; 2:1-7.

24 Arcaro CA, Gutierrez VO, Assis RP, Moreira TF, Costa PI, Baviera AM et al. Piperine, a natural bioenhancer, nullifies the antidiabetic and antioxidant activities of curcumin in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS ONE* 2014; 9(12):1-21.

25 Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001; 37(3):293-303.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

26 Baliga MS, Bhat HP, Baliga BRV, Wilson R, Palatty PL. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): a review. *Food Research International* 2011; 44:1776-89.

Formatado: Português (Brasil)

27 Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara TJ. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(6):940-50.

28 Reis JS, Veloso CA, Mattos RT, Purish S, Nogueira-Machado JA. Estresse oxidativo: revisão da sinalização metabólica no diabetes tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; 52(7):1096-105.

29 Vicentim AL, Marcellino MCL. Efeito do pó do cacau (*Theobroma cacao*) e seus princípios ativos na pressão arterial de portadores do diabetes mellitus tipo II. *Salusvita* 2012; 31(1):29-40.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

30 Taş S, Sarandöl E, Dirican M. Vitamin B6 supplementation improves oxidative stress and enhances serum paraoxonase/arylesterase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Scientific World Journal* 2014.

31 Feng B, Ruiz MA, Chakrabarti S, 2013. Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2013; 91:213–20.

32 Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova* 2006; 29(1):113-23.

33 Yaduvanshi SK, Srivastava N, Prasad GB, Yadav M, Jain S, Yadav H. Genotoxic potential of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation and DNA repair enzymes (Fpg and Endo III) in alloxan injected diabetic rats. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012.

34 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 1969; 244(22):6049-55.

35 Delbin MA, Davel APC, Couto GK, Araújo GG, Rossoni LV, Antunes E. Interaction between advanced glycation end products formation and vascular responses in femoral and coronary arteries from exercised diabetic rats. *PLoS ONE* 2012; 7(12):1-15.

36 Yu LW, Latriano L, Duncan S, Hartwick RA, Witz G. High-performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans,trans-muconaldehyde. *Anal Biochem.* 1986; 156(2):326-33.

37 Yuan CY, Lee YJ, Hsu GSW. Aluminum overload increases oxidative stress in four functional brain areas of neonatal rats. *Journal of Biomedical Science* 2012, 19(51):1-9.

38 Bass DA, Olbrantz P, Szejda P, Seeds MC, McCall CE. Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *The Journal of Immunology* 1986; 136(3):860-6.

39 Helmstädter A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae) against diabetes – 125 years of research. *Pharmazie* 2008; 63:91-101.

40 Dusane MB, Joshi BN. Seeds of *Syzygium cumini* (L.) Skeels: potencial for islet regeneration in experimental diabetes. *Journal of Chinese Integrative Medicine* 2011; 9(12):1380-7.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

41 Ayyanar M, Subash-Babu P. *Syzygium cumini* (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012; 240-6.

42 Migliato KF, Baby AR, Zague V, Velasco MVR, Corrêa MA, Sacramento LVS et al. Ação farmacológica de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Acta Farm. Bonaerense 2006; 25(2):310-4.

43 Soares JJ. Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels [dissertação]. Universidade Federal do Pampa; 2013.

44 Gowri SS, Vasantha K. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. International Journal of PharmTech Research 2010; 2(2):1569-73.

45 Kaneria M, Chanda S. Evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of *Syzygium Cumini* L. leaves extracted sequentially in diferent solventes. Journal of Food Biochemistry 2011.

46 Bopp A, De Bona KS, Bellé LP, Moresco RN, Moretto MB. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. Fundamental & Clinical Pharmacology 2009; 23:501–7.

47 Jagetia GC, Baliga MS. *Syzygium cumini* (Jamun) reduces the radiation-induced DNA damage in the cultured human peripheral blood lymphocytes: a preliminary study. Toxicology Letters 2002; 132:19–25.

48 Bartolome A, Mandapa K, David KJ, Sevilla F, Villanueva J. SOS-red fluorescent protein (RFP) bioassay system for monitoring of antigenotoxic activity in plant extracts. Biosensors and Bioelectronics 2006; 21:2114–20.

49 De Bona KS, Bellé LP, Bittencourt PER, Bonfanti G, Cargnelluti LO, Pimentel VC et al. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in patients with type 2 diabetes: ben *Syzygium cumini* leaf extract *in vitro*. Diab Res Clin Pract 2011; 1-7.

50 Reynertson KA, Yanga H, Jianga B, Basileb MJ, Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. Food Chem. 2008; 109(4):883–90.

51 World Health Organization (WHO). Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2011.

52 Zdrenghea D, Pop D, Penciu O, Zdrenghea V, Zdrenghea M. Rehabilitation in diabetic patients. *Rom. J. Intern. Med.* 2009; 47(4):309–17.

53 Bouchla A, Karatzanos E, Gerovasili V, Zerva E, Nanas S. Neuromuscular electrical stimulation as an alternative means of exercise for the critically ill. *Archives of Hellenic Medicine* 2009; 26(6):759-77.

54 De Angelis KLD, Schaan BD, Maeda CY, Dall'Ago P, Wichi RB, Irigoyen MC. Cardiovascular control in experimental diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35:1091-100.

55 Rossi DM, Valenti VE, Navega MT. Exercise training attenuates acute hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetic female rats. *Clinics* 2011; 66(9):1615-19.

Formatado: Inglês (Estados Unidos)

56 Cauza E, Hanusch-Enserer U, Strasser B, Ludvik B, Metz-Schimmerl S, Pacini G et al. The relative benefits of endurance and strength training on the metabolic factors and muscle function of people with type 2 diabetes mellitus. *Arch Phys Med Rehabil* 2005; 86:1527-33.

57 Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of physical activity on insulin resistance, inflammation and oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2013; 7(8):1764-6.

58 Khan KM, Thompson AM, Blair SN, Sallis JF, Powell KE, Bull FC et al. Sport and exercise as contributors to the health of nations. *Lancet* 2012; 380:59–64.

59 Kan NW, Huang WC, Lin WT, Huang CY, Wen KC, Chiang HM et al. Hepatoprotective effects of *Ixora parviflora* extract against exhaustive exercise-induced oxidative stress in mice. *Molecules* 2013, 18:10721-32.

60 Fisher-Wellman K, Bloomer RJ. Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine* 2009, 8(1):1-25.

61 Hawthorn WD, *The Virtual Field Herbarium*. Disponível em:

<http://herbaria.plants.ox.ac.uk/vfh/image/index.php?item=1656&project=7813>

62 Hoola van Nooten B. Fleurs, fruits et feuillages choisis de l'île de Java: peints d'après nature, 1880. Disponible en:

http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=36180

4 ARTIGO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O presente manuscrito será submetido e está apresentado nas normas da Revista Diabetes & Metabolism.

Para facilitar a leitura, as figuras foram dispostas no decorrer do texto.

Effects of crude hydroalcoholic extract of *Syzygium cumini* (L.) Skeels leaves and continuous aerobic training in diabetic rats induced by high-fat diet and low doses of streptozotocin

Baldissera G¹, Sperotto NDM¹, Rosa HT¹, Moura DJ¹, Dal Lago P², Nunes RB², Saffi J¹.

¹Laboratory of Genetic Toxicology, - UFCSPA

²Laboratory of Experimental Physiology - UFCSPA

***S. cumini* and aerobic training in diabetic rats**

Corresponding author:

Jenifer Saffi

jenifers@ufcspa.edu.br

UFCSPA – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Sarmento Leite, 245 - Centro, Porto Alegre, RS, Brasil

Phone +55 51 3303-8861