

TAÍS MILENE SANTOS DE PAIVA OLIVEIRA

EFEITOS DO EXTRATO DE *RHYNCHELYTRUM REPENS* EM MODELO MURINO
DE OBESIDADE E HIPERGLICEMIA INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA

BRASÍLIA - DF

2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAÍS MILENE SANTOS DE PAIVA OLIVEIRA

EFEITOS DO EXTRATO DE *RHYNCHELYTRUM REPENS* EM MODELO MURINO
DE OBESIDADE E HIPERGLICEMIA INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Angélica Amorim Amato

Co-orientadora: Michella Soares Coêlho

BRASÍLIA - DF

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor da vida, e à minha família pelo apoio e carinho.

RESUMO

O *diabetes mellitus* do tipo 2 (DM2) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia crônica, resultante da combinação entre resistência à ação da insulina e deficiência de secreção de insulina. Representa hoje importante problema de saúde pública mundial, em razão do aumento de sua prevalência, em proporções epidêmicas, e da morbimortalidade que determina. A *Rhynchelytrum repens* (RR) é uma planta rica em fibras solúveis do tipo β -glucanos, avaliada previamente em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos, semelhante ao *diabetes mellitus* tipo 1, com bons resultados sobre o controle glicêmico. Seus efeitos, contudo, não foram explorados em modelos animais de DM2. O objetivo deste projeto foi avaliar o efeito do extrato da RR sobre variáveis metabólicas em camundongos com obesidade e diabetes induzidos por dieta hiperlipídica (DHL). Para tanto, 16 camundongos Swiss machos alimentados com DHL da 5^a à 16^a semana de vida foram aleatoriamente divididos em 4 grupos contendo cada animais cada para tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d), ou extrato de RR nas doses de 50 ou 100 mg/kg/d, durante 19 dias, por via intraperitoneal. Um grupo de 4 animais alimentados desde o desmame até o final do estudo foi tratado com veículo. Foram avaliados, em resposta ao tratamento, massa corporal, ganho de massa corporal, ingestão hídrica, ingestão de dieta, eficiência metabólica e tolerância à glicose. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e foi coletada amostra de sangue para avaliação do perfil lipídico e concentração circulante de transaminases, além de determinadas a massa de diferentes depósitos de tecido adiposo e as características histológica do fígado. Nas duas doses testadas, o tratamento com o extrato de RR resultou em redução do ganho de massa corporal em resposta à DHL, tendência de melhora da tolerância à glicose, redução da massa adiposa visceral retroperitoneal sem alteração da massa adiposa inguinal, tendência de redução da ingestão de energia e da eficiência metabólica e redução do acúmulo lipídico no fígado, em relação aos animais alimentados com DHL e tratados com veículo. Não foram observadas modificações do perfil lipídico ou da concentração circulante de transaminases nos grupos tratados com extrato de RR. Esses resultados sugerem que o extrato de RR apresenta efeitos metabólicos favoráveis independentes de sua ação como fibra solúvel no trato gastrointestinal, e que represente fonte promissora de compostos para o tratamento do DM2 e dos distúrbios metabólicos a ele associados.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2, *Rhynchelytrum Repens*, adiposidade, esteatose hepática.

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is a group of metabolic diseases sharing chronic hyperglycemia, resulting from a combination of insulin resistance and secretory deficiency of pancreatic beta cells. It currently represents a worldwide public health problem due to its increasing frequency, in epidemic proportions, and to its associated morbidity and mortality. *Rhynchelytrum repens* (RR) is a plant rich in the soluble fiber beta-glucan and was previously investigated in a rodent model of streptozotocin-induced diabetes, which is similar to type 1 diabetes, with a favorable effect on blood glucose levels. However, its effects were not explored in T2D animal models. The aim of this work was to investigate the effect of a RR extract on metabolic variables of mice with obesity and diabetes induced by high fat diet (HFD). Sixteen male Swiss mice were fed a HFD from the 5th until the 16th week of life and at this time were randomly assigned into 4 groups containing 4 mice each to receive vehicle, rosiglitazone (4 mg/kg/d) or RR extract at the doses of 50 and 100 mg/kg/d, for 19 days, by the intraperitoneal route. Four animals were fed a control diet from weaning until the end of the study and treated with vehicle. Body weight, body weight gain, water and diet ingestion, metabolic efficiency and glucose tolerance in response to treatment were determined. At the end of treatment, mice were euthanized and blood samples were drawn for lipid profile and serum levels of liver enzymes determination. The mass of different adipose tissue depots was evaluated, as well of liver histological features. Treatment with both doses of RR extract reduced weight gain in response to HFD and in a trend towards improved glucose tolerance. There was a significant decrease in visceral retroperitoneal adipose tissue mass without changes in subcutaneous inguinal adipose tissue mass, in addition to a trend towards reduced energy intake and metabolic efficiency. Moreover, mice fed a HFD and treated with both RR extract showed reduced liver fat accumulation when compared to HFD-fed mice treated with vehicle. No changes in lipid profile or serum levels of liver enzymes were observed. These findings suggest that the RR extract has favorable metabolic effects independently of its action as a soluble fiber in the digestive tract, and may hence be viewed as a promising source of active compounds to treat T2D and its associated metabolic disturbances.

Keywords: type 2 diabetes, *Rhynchelytrum Repens*, adiposity, hepatic steatosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos que relacionam a obesidade visceral à resistência insulínica.	16
Figura 2. <i>Rhynchelytrum repens</i> ou capim favorito.	20
Figura 3. Estrutura do beta-glucano encontrado em plantas.	21
Figura 4. Massa corporal de camundongos Swiss alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica.	33
Figura 5. Hiperglicemia induzida pela dieta hiperlipídica.	34
Figura 6. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre o ganho de massa corporal.	35
Figura 7. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre a tolerância à glicose.	37
Figura 8. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre adiposidade visceral.	38
Figura 9. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre a massa de tecido adiposo	39
Figura 10. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre a energia ingerida e a eficiência metabólica	41
Figura 11. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre o perfil lipídico.	42
Figura 12. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre enzimas hepáticas.	44
Figura 13. Efeito do extrato <i>Rynchelytrum repens</i> sobre características histológicas do fígado.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Glicemia (média \pm desvio-padrão) basal e após sobrecarga intraperitoneal de glicose.	46
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Genes relacionados ao risco de desenvolvimento de DM2.	14
Quadro 2 - Aplicações clínicas dos beta-glucanos.	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	Associação Americana de Diabetes (<i>American Diabetes Association</i>)
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
DHL	Dieta hiperlipídica
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> do tipo 2
E100	Extrato de RR na dose de 100 mg/kg/d
E50	Extrato de RR na dose de 50 mg/kg/d
EPM	Erro padrão da média
IDF	Federação internacional do diabetes (<i>International Diabetes Federation</i>)
RR	<i>Rynchelytrum repens</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 DIABETES MELLITUS	13
2.1.1 Fisiopatologia do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	13
2.1.2 Tratamento do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	17
2.1.2.1 Terapia médica nutricional do <i>diabetes mellitus</i>	17
2.1.2.2 Terapia farmacológica do <i>diabetes mellitus</i> tipo 2	18
2.2 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	19
2.3 <i>RHYNCHELYTRUM REPENS</i> E BETA-GLUCANO	19
3 JUSTIFICATIVA	23
4 OBJETIVOS	24
4.1 OBJETIVO GERAL	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5 MÉTODOS	25
5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	25
5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	25
5.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO	25
5.4 MODELO ANIMAL	26
5.5 DIETAS	26
5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
5.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	27
5.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	28
5.9 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE	28
5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO	29
5.10.1 Fixação do tecido hepático	29
5.10.2 Inclusão em parafina	29

5.10.3 Corte no micrótomo	29
5.10.4 Coloração com hematoxilina-eosina	30
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
6 RESULTADOS	32
6.1 GANHO DE MASSA CORPORAL E HIPERGLICEMIA INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA	32
6.2 EFEITO DO EXTRATO <i>RYNCHELYTRUM REPENS</i> SOBRE O GANHO DE MASSA CORPORAL E TOLERÂNCIA À GLICOSE	34
6.3 EFEITO DO EXTRATO <i>RYNCHELYTRUM REPENS</i> SOBRE A ADIPOSIDADE, INGESTÃO HÍDRICA E DE ENERGIA	37
6.4 DO EXTRATO <i>RYNCHELYTRUM REPENS</i> SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ENZIMAS HEPÁTICAS	42
6.5 EFEITO DO EXTRATO <i>RYNCHELYTRUM REPENS</i> SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO	44
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO	52
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO I – Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília .	61

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por defeitos na síntese, secreção e/ou ação da insulina. Segundo estimativas da Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation, IDF*), havia, em 2013, cerca de 387 milhões de pessoas com DM, com perspectiva de aumento para 592 milhões de casos no ano de 2035 (1). Estima-se, ainda, que aproximadamente 179 milhões de pessoas sejam portadoras da doença, porém sem diagnóstico (1). O Brasil ocupa a primeira posição, em prevalência, entre os dos países da América Latina, e o quarto no mundo, com uma população de cerca de 11 milhões de diabéticos (1).

A importância da doença é representada não apenas por sua prevalência, mas também pela morbimortalidade a ela associada. No ano de 2014, foram constatadas 4,9 milhões de mortes em todo mundo em decorrência do DM (1). Isto é atribuído às suas complicações macrovasculares (doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença vascular periférica) e microvasculares (retinopatia, neuropatia e nefropatia) (2).

As duas formas mais frequentes de DM são o DM tipo 1 (DM1) e DM tipo 2 (DM2). O DM1, em geral de etiologia autoimune, é caracterizado por destruição das células beta pancreáticas e deficiência absoluta de insulina (3). O DM2, mais frequente, apresenta como componentes fisiopatológicos a resistência à ação da insulina e a deficiência secretória das células beta pancreáticas (3).

A abordagem terapêutica atual do DM2 visa diminuir a resistência à insulina e melhorar a função da célula beta pancreática com dieta, exercícios, anti-hiperglicemiantes e, nos pacientes obesos, com medicamentos específicos anti-obesidade. Entre as estratégias dietéticas para o tratamento do DM2, destacam-se dietas com elevado teor de fibras, que diminuem as concentrações plasmáticas de glicose e colesterol (4). Segundo a Associação Dietética Americana (*American Dietetic Association, ADA*), fibra alimentar é a porção de plantas ou carboidratos análogos que são resistentes à digestão e absorção no intestino delgado de humanos, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso. O termo fibra alimentar inclui polissacarídeos, lignina, oligossacarídeos e substâncias associadas de plantas (5).

Os β -glucanos são polissacarídeos de monômeros de glicose unidos por ligações β -glicosídicas. Estão presentes em fibras solúveis e, quando ingeridos, diminuem a glicemia pós-prandial, efeito associado à propriedade deste polímero, quando em solução, formar uma camada gelatinosa no intestino que reduz a taxa de absorção de nutrientes no intestino delgado. Estes efeitos resultam, também, em redução da concentração plasmática de colesterol (6). A *Rhynchelytrum repens*, conhecida como “capim favorito”, é uma planta utilizada popularmente no tratamento do DM (7). Seus efeitos anti-hiperglicemiantes foram caracterizados em modelo murino de DM induzido pela estreptozotocina (7,8) e atribuídos, pelo menos em parte, ao seu rico conteúdo de beta-glucano. O modelo de DM induzido por estreptozotocina apresenta características que o assemelham ao DM1, na medida em que este composto resulta em destruição seletiva das células beta pancreáticas. Para nosso conhecimento, este foi o único modelo de DM em que os efeitos da *Rhynchelytrum repens* foram testados, de forma que carecem, na literatura, estudos que tenham abordado os seus efeitos em modelo de DM2, o mais prevalente. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos do extrato de *Rhynchelytrum repens* em modelo murino de obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O DM é caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de deficiência absoluta ou relativa da secreção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas (9). É considerado importante problema de saúde pública mundial, em razão de sua crescente prevalência e também da morbimortalidade que determina. Segundo relatório da Federação Internacional de Diabetes (1), existem aproximadamente 387 milhões de pacientes diabéticos no mundo, com perspectiva de aumento para 592 milhões até 2035 (1). As complicações vasculares da doença apresentam natureza isquêmica e são classificadas em microvasculares e macrovasculares. As complicações microvasculares, específicas do DM, incluem a retinopatia, nefropatia e neuropatia. As complicações macrovasculares, que são a doença arterial coronariana, doença cerebrovascular e doença arterial periférica, embora não específicas do DM, representam hoje a principal causa de mortalidade em diversos países (1).

Há duas principais formas da doença, o DM tipo 1 (DM1) e o tipo 2 (DM2). O DM1, que representa cerca de 5 a 10% dos casos de DM, é causado pela destruição autoimune das células β -pancreáticas, relacionada fatores genéticos e a gatilhos ambientais secundários, como toxinas e vírus. É mais comum entre crianças e adultos jovens e, em razão da deficiência absoluta de insulina, desde o diagnóstico é necessário tratamento com insulina exógena para controle metabólico (1). O DM2 representa aproximadamente 90% dos casos de DM e tem como componentes fisiopatológicos a resistência à ação da insulina e a deficiência secretória das células β -pancreáticas. Além disso, frequentemente associa-se à obesidade e manifesta-se no contexto da síndrome metabólica (10).

2.1.1 Fisiopatologia do *diabetes mellitus* tipo 2

O DM2 é um grupo de doenças metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica resultante da combinação de graus variados de resistência à ação da insulina e deficiência da secreção da insulina (11). Em razão de sua elevada

prevalência e associação com complicações vasculares (1), representa importante determinante de morbimortalidade, inclusive entre indivíduos mais jovens (1).

A fisiopatologia do DM2 é complexa e parece resultar da interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, que influenciam a sensibilidade insulínica e a função secretória da célula beta. A herança genética é poligênica e os estudos genéticos em humanos, em particular os estudos de mapeamento amplo do genoma, permitiram a identificação de diversos loci de suscetibilidade ao DM2 (Quadro 1). Nestes loci, são encontrados polimorfismos que estão associados a aumento do risco de desenvolvimento da doença.

Quadro 1 - Genes relacionados ao risco de desenvolvimento de DM2.

Gene	Produto	Referência
<i>TCF7L2</i>	Fator de transcrição 7 semelhante ao 2	(12–16)
<i>SLC30A8</i>	Família 30 de carreadores de solutos (transportador de zinco), membro 8	(13–16)
<i>HHEX/IDE</i>	Não descrito	(13–16)
<i>KCNJ11</i>	Canal de potássio, retificador interno, subfamília J, membro 11	(13–16)
<i>NOTCH2</i>	Proteína 2 homóloga do <i>locus</i> neurogênico <i>notch</i>	(17)
<i>JAZF1</i>	Proteína 27 de interação com TAK-1 ou proteína 802 dedo de zinco	(17)
<i>KCNJ11</i>	Subunidade alfa do componente de ação lenta do canal de potássio	(18–20)
<i>WFS1</i>	Wolframina	(10)
<i>GK</i>	Glicoquinase	(21)
<i>IPF-1/PDX-1</i>	Fator de transcrição da célula beta	(22,23)
<i>ADRA2A</i>	Receptor adrenérgico alfa	(24,25)
<i>MODY1</i>	Fator hepatocitário nuclear	(26)
<i>MODY3</i>	Fator hepatocitário nuclear	(27)
<i>ADRB3</i>	Receptor adrenérgico beta 3	(28,29)
<i>PPARG</i>	Receptor gama ativado por proliferadores peroxissomais	(30)
<i>CAPN10</i>	Cisteína-protease calpaína 10	(30–32)
<i>SLC16A11</i>	Transportador de membrana da superfamília de transportadores principais (transportador vesicular de glutamato)	(20)

A maior parte destes genes codifica proteínas relacionadas ao desenvolvimento e a função da célula beta. Entre os apresentados no Quadro 1, apenas o *PPARG* está relacionado também à sinalização insulínica. Este dado indica que a função da célula beta é crítica para o desenvolvimento do DM2. A presença de resistência à ação da insulina no contexto de função secretória da célula beta normal resulta em hiperinsulinemia compensatória e ausência de hiperglicemia. Na ausência de função secretória adequada, no entanto, é observada incapacidade de compensação da resistência insulínica e, assim, desenvolvimento da hiperglicemia que caracteriza o DM (33–35).

Os fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento do DM2 incluem escolhas alimentares inadequadas, sedentarismo e exposição a contaminantes ambientais (denominados obesogênicos ambientais) que, por sua vez, determinam ganho de peso e obesidade (36,37). A obesidade, em especial quando caracterizada por aumento da gordura visceral (abdominal), é importante determinante da resistência à ação da insulina (38–40). Embora os mecanismos desta associação não estejam completamente definidos, acredita-se que a participação de vias de sinalização inflamatória iniciadas no tecido adiposo visceral seja crítica (39,40).

No contexto da obesidade visceral, os adipócitos e os macrófagos residentes no tecido adiposo secretam uma variedade de citocinas com atividade pró-inflamatória que apresentam atividade sistêmica, em especial no músculo esquelético e no fígado, que representam tecidos chave da ação da insulina. Entre estas citocinas, destacam-se o fator de necrose tumoral alfa (41–44), interleucina 6 (45), inibidor 1 do ativador do plasminogênio (46), resistina (47) e proteína 4 ligadora do retinol (48–50) (Figura 1). Em consistência, diversos estudos indicam associação entre o aumento de marcadores séricos de inflamação, incluindo proteína C reativa, interleucina 6, inibidor 1 do ativador do plasminogênio e fator de necrose, e a presença de obesidade visceral e DM2 (51,52). A obesidade visceral está associada também a aumento da lipólise neste depósito e a liberação de ácidos graxos livres também é implicada no desenvolvimento de resistência insulínica em tecidos chave da ação da insulina (53,54).

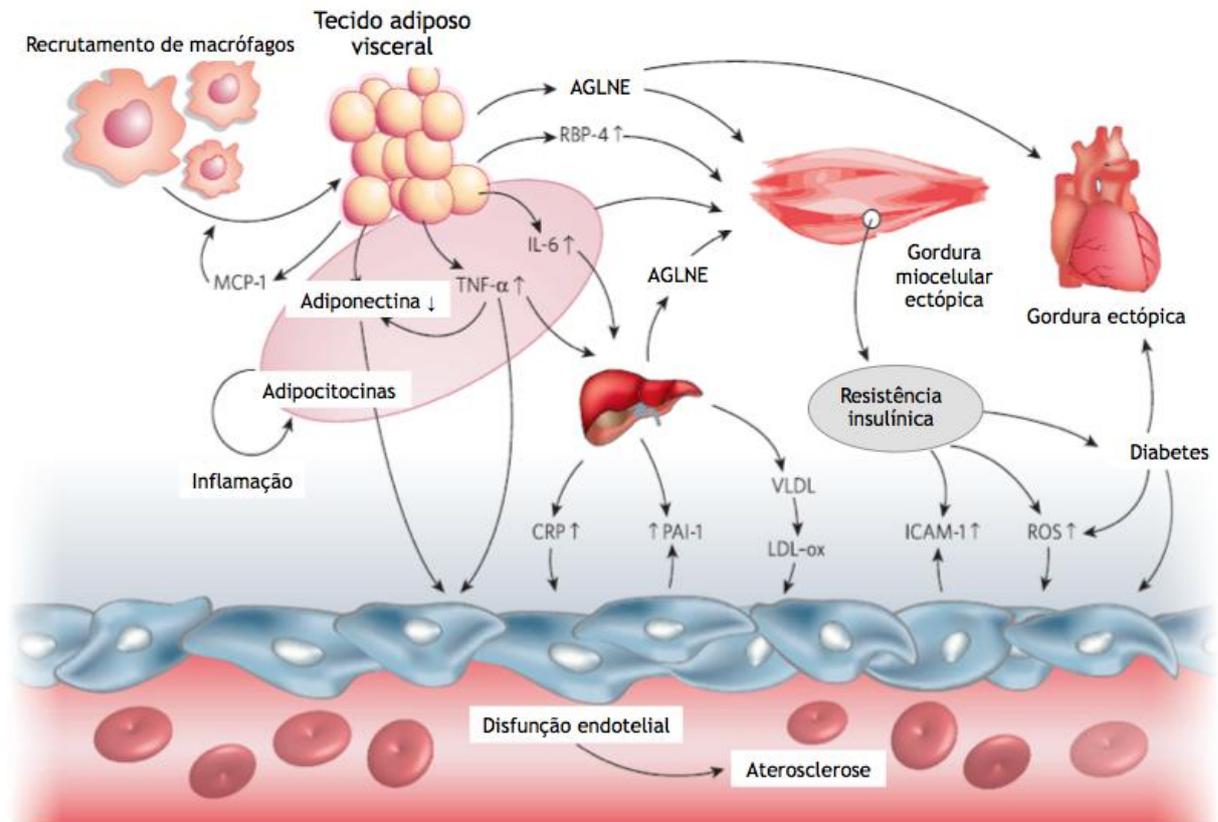


Figura 1. Mecanismos que relacionam a obesidade visceral à resistência insulínica. O tecido adiposo visceral contribui para o desenvolvimento de resistência insulínica pelo efeito direto de citocinas (TNF- α , IL-6) e outras adipocinas (RBP-4), de redução da adiponectina e pela deposição de AGLNE em outros tecidos, em especial fígado e músculo esquelético. AGLNE: ácidos graxos livres não esterificados, RBP-4: proteína 4 ligadora do retinol, IL-6: interleucina 6, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, MCP-1: proteína 1 quimiotática de macrófagos, CPR: proteína C reativa, PAI-1: inibidor 1 do ativador do plasminogênio, VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade, LDL-ox: lipoproteína de baixa densidade oxidada, ROS: espécies reativas de oxigênio, ICAM-1: molécula 1 de adesão intercelular. Adaptado de (55).

Outra característica da obesidade visceral que influencia o desenvolvimento de resistência insulínica e, assim, o risco de desenvolvimento de DM2, é a secreção de adiponectina. Esta é uma citocina derivada do tecido adiposo cujos efeitos fisiológicos incluem a redução da resposta inflamatória sistêmica, a redução da concentração circulantes de ácidos graxos livres, melhora do perfil lipídico e glicêmico (56,57). Na obesidade visceral, é observada redução da concentração circulante de adiponectina (58) significativamente correlacionada ao grau de resistência insulínica (59,60).

2.1.2 Tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2

A abordagem terapêutica do DM2 envolve uma variedade de aspectos que influenciam o controle metabólico e a morbimortalidade relacionada à doença. Entre eles destacam-se a educação a respeito da doença, medidas não farmacológicas e farmacológicas para controle da glicemia e de fatores de risco cardiovascular, empregados de acordo com características individuais do paciente.

As medidas não farmacológicas para obtenção de controle glicêmico incluem modificações dietéticas, atividade física e, em alguns casos, intervenções psicológicas. As medidas dietéticas, também denominadas terapia médica nutricional, têm como objetivo auxiliar, além do controle glicêmico, o controle do perfil lipídico, da pressão arterial e da massa corporal quando necessário (61). Atividade física é recomendada para todos os adultos portadores de DM. Entre os portadores de DM2, é observado que a atividade física melhora o controle glicêmico independentemente de sua influência sobre a massa corporal e esse efeito é atribuído a melhora da sensibilidade à insulina (62,63).

2.1.2.1 Terapia médica nutricional do *diabetes mellitus*

A dieta é importante componente da abordagem terapêutica do paciente diabético (2) e no DM2, em particular, tem o objetivo de auxiliar o controle de diversas variáveis metabólicas (2). A elaboração do plano nutricional do portador de DM2 deve considerar diversos aspectos, entre os quais se destacam a ingestão calórica diária, a necessidade de controle da massa corporal e a quantidade de exercícios físicos praticada, a consistência do conteúdo de carboidrato ingerido nas refeições, o conteúdo nutricional e os horários das refeições (2).

A ingestão calórica diária deve incluir aporte adequado de macro e micronutrientes. Entre os macronutrientes na dieta (carboidratos, proteínas e lipídeos), os carboidratos influenciam diretamente a glicemia, na medida em que sua digestão no trato gastrointestinal tem como produto a glicose (64).

Os carboidratos são tradicionalmente classificados em simples (mono e dissacarídeos) e complexos (polissacarídeos). Um aspecto importante no contexto do tratamento do DM é a influência que o carboidrato exerce sobre a glicemia. Considerando que carboidratos simples e complexos podem apresentar efeitos

semelhantes sobre a glicemia, do ponto de vista prático estes macronutrientes são classificados com base no índice glicêmico (64) e também caracterizados de acordo com o seu conteúdo de fibras, que representam o carboidrato não digerível (65). O índice glicêmico é uma medida do impacto do carboidrato sobre a glicemia, determinada pelo aumento da glicemia após a ingestão de 50g do carboidrato em comparação com a mesma quantidade de um carboidrato em um alimento referência, em geral o pão ou a própria glicose. Valores abaixo de 55 são considerados baixos e acima de 70, elevados (66). Apesar da aparente relevância prática, o conceito de índice glicêmico e sua aplicação no tratamento do DM são bastante discutidos (67,68). Estas discussões são centradas na possibilidade de variação do índice glicêmico em uma refeição mista, contendo outros macronutrientes (69,70), e também na ausência de estudos de longo prazo que indiquem de forma definitiva sua efetividade no tratamento do DM (64).

Na tentativa de agregar ao conceito de índice glicêmico a quantidade de carboidrato ingerida, que também influencia o efeito deste macronutriente sobre a glicemia, foi desenvolvido o conceito de carga glicêmica, que representa o produto entre o valor do índice glicêmico de um alimento e seu conteúdo de carboidrato. Assim, cada unidade da carga glicêmica representa o efeito sobre a glicemia de 1g do carboidrato referência, o pão branco. Alimentos pobres em fibra em geral apresentam carga glicêmica elevada, ao passo que alimentos ricos em fibras apresentam carga glicêmica baixa. Neste sentido, as recomendações nutricionais da Associação Americana de Diabéticos incluem a ingestão diária de pelo menos 14 g de fibras para cada 1000 kcal ingeridas (71).

2.1.2.2 Terapia farmacológica do *diabetes mellitus* tipo 2

Em concordância com a fisiopatologia complexa e multifatorial do DM2, há uma variedade de classes de medicamentos, denominados anti-hiperglicemiantes, para o controle da glicemia. Por mecanismos de ação distintos, estes medicamentos influenciam os diferentes componentes fisiopatológicos da doença: a resistência insulínica, a disfunção secretória da célula beta pancreática, o aumento da produção hepática de glicose, entre outros (4).

Em geral, o tratamento é iniciado com um único medicamento e, à medida que se torna necessário para manutenção do controle glicêmico, medicamentos de diferentes classes são associados.

2.2 PRODUTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DO *DIABETES MELLITUS*

A utilização de produtos naturais para o tratamento de várias doenças não é recente. Dados históricos reforçam a prática da produção, a partir de plantas, de preparações com finalidade terapêutica pelos humanos (72). Apesar da disponibilidade de inúmeros medicamentos sintéticos para o tratamento do diabetes, a utilização de produtos naturais, mesmo sem prescrição médica, é comum entre os pacientes (73). Este cenário é decorrente de diversos aspectos, entre eles os efeitos adversos relacionados aos medicamentos sintéticos, preocupações a respeito da segurança destes, ou mesmo custo mais acessível e maior disponibilidade dos produtos naturais, além da crença de que são mais seguros que os medicamentos sintéticos (73,74). Soma-se a estes aspectos o fato de as plantas representarem importante fonte de descoberta de novos medicamentos (73).

Apesar da ampla utilização de produtos naturais no tratamento do DM (75), muitos deles não são avaliados de forma adequada quanto aos seus possíveis mecanismos de ação, efetividade e segurança, por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos.

2.3 *RHYNCHELYTRUM REPENS* E BETA-GLUCANO

Muitas espécies de gramíneas tropicais, especialmente aquelas originadas da África são consideradas invasoras de reservas naturais americanas devido à sua capacidade de substituir espécies nativas (76). Entre estas gramíneas, está a *Rhynchelytrum repens* ou *Melinis repens* (Figura 2), conhecida popularmente como capim-favorito, capim-rosado ou capim-natal. É uma planta originária da África do Sul e que foi introduzida no Brasil por volta de 1930. Desde então, é facilmente encontrada em áreas abertas e ao longo de rodovias (7).



Figura 2. *Rhynchelytrum repens* ou capim favorito. Fonte: Embrapa Milho e Sorgo. Disponível em <http://panorama.cnpms.embrapa.br/plantas-daninhas/identificacao/folhas-estreitas/capim-favorito-rhynchelytrum-repens>

No Brasil, a *R. repens* planta é utilizada popularmente no tratamento do DM, com relatos de redução de até 65% da glicemia de jejum de indivíduos diabéticos (77). Estudos envolvendo ratos com diabetes induzidos por estreptozotocina confirmaram o efeito anti-hiperglicemiante do extrato aquoso da *R. repens* e os resultados foram atribuídos à grande quantidade de beta-glucano encontrada no extrato (7,8). Nestes estudos, a presença de beta-glucano no extrato de *R. repens* foi determinada a partir de sua hidrólise por endoglucanase proveniente da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis*, seguida da análise dos polissacarídeos resultantes por cromatografia líquida de alta pressão (7,8).

Os beta-glucanos são polissacarídeos constituídos por moléculas de D-glicose ligadas por ligações beta-glicosídicas (Figura 3) e encontrados na parede celular não apenas de plantas, como a *R. repens*, mas também de bactérias e fungos Ra. Os tipos de ligação glicosídica entre as unidades monoméricas de glicose varia de acordo com a fonte de beta-glucano (plantas, bactérias ou fungos). Nas plantas, são encontradas ligações glicosídicas 1,3 e ligações 1,4 (ou seja, ligações glicosídicas que conectam o carbono 1 de uma molécula de D-glicose ao carbono 3 da segunda molécula de D-glicose, no primeiro caso, e o carbono 1 e o carbono 4, no segundo) (78).

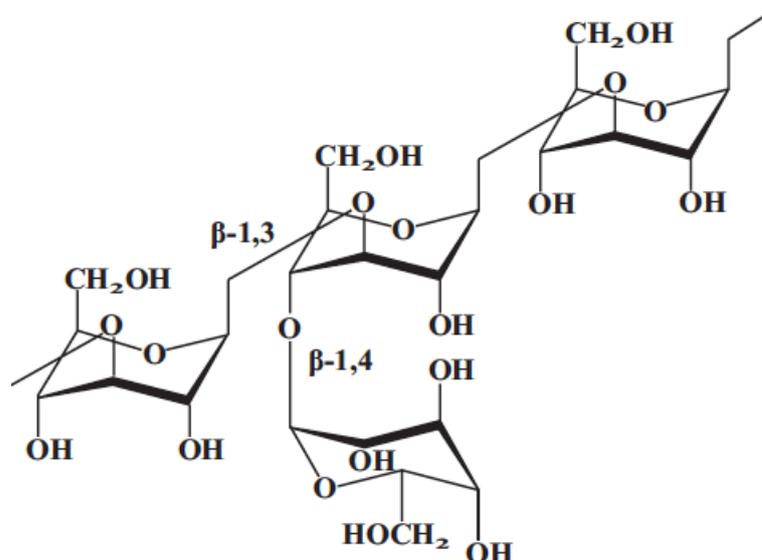


Figura 3. Estrutura do beta-glucano encontrado em plantas, com ligações glicosídicas 1,3 e 1,4 entre os monômeros de D-Glicose. Fonte: Ribeiro et al., 2009 (78).

Os beta-glucanos são um tipo de fibra solúvel e, quando ingeridos, são capazes de resistir ao ácido gástrico. No intestino delgado, formam uma solução viscosa que recobre o epitélio intestinal e reduz a absorção de carboidratos e lipídeos. Este efeito é considerado o mecanismo de sua atividade, observada há várias décadas, em reduzir a glicemia pós-prandial (79) e a concentração circulante de lipídeos (80). É descrita também a presença de um receptor de beta-glucano (Dectina 1) em células do sistema imunitário de roedores e humanos (81). Acredita-se que a ativação de macrófagos da parede intestinal pela ligação dos beta-glucanos ao seu receptor na superfície destas células seja responsável pelo papel imunomodulador deste polissacarídeo e seus efeitos benéficos em doenças que envolvem a desregulação do sistema imunitário (82–85). Os diferentes efeitos dos beta-glucanos, na parede intestinal e sobre a atividade do sistema imunitário, explicam a variedade de aplicações clínicas deste polissacarídeo descrita na literatura (Quadro 2).

Quadro 2 - Aplicações clínicas dos beta-glucanos.

Efeito	Mecanismo
Anti-hiperglicemiante e hipolipemiante	Redução da absorção intestinal de carboidratos e lipídeos
Anti-hipertensivo	(?)
Anti-tumoral (efeito adjuvante)	Imunomodulação
Prevenção e tratamento de infecções	Imunomodulação

Adaptado de: Rahar e cols, 2011 (84)

3 JUSTIFICATIVA

A *Rhynchelytrum repens* é uma planta rica em fibras solúveis do tipo beta-glucano e seu extrato foi avaliado previamente em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em ratos, com bons resultados sobre o controle glicêmico (7). A estreptozotocina é uma droga com efeito tóxico sobre as células beta produtoras de insulina, de modo que o modelo de diabetes induzido por esta droga assemelha-se ao DM1, uma forma menos comum de diabetes e resultante de deficiência absoluta da secreção de insulina, sem resistência insulínica associada. Embora compartilhe com o DM2 a hiperglicemia e suas complicações crônicas, o tratamento destas duas formas de diabetes apresenta aspectos diferentes. Considerando-se que a deficiência secretória de insulina representa um componente fisiopatológico do DM2, ainda que menos acentuado que o observado no DM1, e que a *R. repens* não foi testada, para nosso conhecimento, em modelo animal de DM2, o objetivo deste projeto é avaliar o efeito do extrato da *R. repens* sobre o controle glicêmico de camundongos com obesidade e diabetes induzidos por dieta hiperlipídica (DHL), tratados com veículo ou com extrato de *R. repens*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do extrato da *Rynchelytrum repens* sobre variáveis metabólicas em camundongos *Swiss* com obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o efeito do extrato da *Rynchelytrum repens*, em camundongos *Swiss* com obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica, sobre:

- (i) Massa corporal, ingestão alimentar, eficiência metabólica e ingestão hídrica.
- (ii) Tolerância à glicose.
- (iii) Concentração sérica de transaminases, triglicérideo e colesterol HDL.
- (iv) Características histológicas do fígado.

5 METODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi realizado em camundongos de acordo com as recomendações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (86). O projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília, com Unb-Doc número 67153/2014 (Anexo I).

Ao final do estudo, a eutanásia realizada nos animais seguiu as Diretrizes de Prática de Eutanásia do CONCEA (87) e o Guia de Boas Prática para Eutanásia em Animais, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (88). Após eutanásia as carcaças dos animais foram descartadas seguindo as normas para este tipo de resíduo (Lei Nacional de Resíduos Sólidos Nº 12.305/2010).

5.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado na região Centro-Oeste (campus universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília) em abril de 2014. Os espécimes de *R. repens* (Willd.) Zizka foram identificadas e uma exsicata depositada no herbário da Universidade de Brasília (UnB) pelo botânico Prof. Dr. Christopher Fagg, do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, sob o *voucher* Fagg CW 2299 (UB).

5.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

O extrato aquoso bruto (4,68 g) de *R repens* foi obtido por infusão, seguida de filtração, congelamento e liofilização. O material vegetal seco foi submetido à extração por infusão com água destilada na proporção de 1:10. A água destilada foi aquecida à ebulição e deixada arrefecer a 70°C e em seguida foi adicionada ao material pulverizado. O recipiente foi tampado e o infuso deixado arrefecer a 50°C, sendo, em seguida, submetido à filtração em papel de filtro. O filtrado foi coletado em frasco de vidro, protegido da luz. O frasco contendo a solução extrativa, preenchido com aproximadamente 50% de seu volume total, foi levado ao *freezer* (modelo EF340, Esmaltec) a -20°C para congelamento na posição inclinada e

posteriormente foi submetido à secagem por liofilização em equipamento (modelo Advantage Plus XL-70, SP Scientific).

5.4 MODELO ANIMAL

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos heterogênicos, obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, da Universidade Federal de São Paulo.

5.5 DIETAS

Os camundongos foram alimentados com dieta controle (10% do total de kcal proveniente de lipídeos) ou dieta hiperlipídica (DHL, 60% do total de kcal proveniente de lipídeo), da 5^a a 20^a semana de vida. A dieta foi obtida da empresa Pragsoluções (São Paulo, Brasil) e administrada na forma de pellet. O acesso à dieta e à água foi livre (*ad libitum*) a administração de DHL teve como objetivo induzir obesidade e hiperglicemia.

Durante o estudo, os camundongos foram mantidos em gaiolas apropriadas, em grupos de 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura controlada (25° C) e ciclo claro/escuro a cada 12 horas (escuro entre 18h00 e 06h00).

5.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quatro camundongos foram alimentados com dieta controle e 16 animais, DHL. Após o desenvolvimento de obesidade e hiperglicemia (16^a semana de vida), os camundongos alimentados com DHL foram subdivididos aleatoriamente (por sorteio) em 4 grupos contendo 4 camundongos cada e foram tratados diariamente, durante 19 dias (entre a 17^a e a 20^a semanas de vida), com diferentes doses do extrato *Rynchelytrum repens* (50 ou 100 mg/kg/dia), rosiglitazona (4 mg/kg/dia, agonista total do PPAR γ) ou veículo via injeção intraperitoneal. As doses do extrato foram selecionadas a partir do estudo de Paula e colaboradores (2005), em que ratos Wistar com DM induzido por estreptozotocina foram tratados com extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d, por via intraperitoneal (7).

Segundo o delineamento descrito acima, foram compostos 5 grupos experimentais, como descrito abaixo:

Grupo 1: dieta controle, tratamento com veículo

Grupo 2: DHL, tratamento com veículo

Grupo 3: DHL, tratamento com rosiglitazona (4 mg/kg/d)

Grupo 4: DHL, tratamento com extrato *Rynchelytrum repens* (50 mg/kg/d)

Grupo 5: DHL, tratamento com extrato *Rynchelytrum repens* (100 mg/kg/d)

O Tween-20 diluído em solução salina (0,25%, v/v; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi usado como veículo. A rosiglitazona foi adquirida da empresa Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EUA) e diluída em veículo. O extrato *Rynchelytrum repens* foi preparado conforme descrito no item 5.3 e também diluído em veículo.

5.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Entre a 5^a e a 16^a semanas de vida, a massa corporal (em g), ingestão de dieta (em g) e ingestão hídrica (em mL) foram avaliados duas vezes por semana, no período matutino. Durante o período do tratamento com o extrato de *R. repens*, rosiglitazona ou veículo (19 dias, da 17^a a 20^a semanas de vida), estas variáveis foram avaliadas diariamente e, a partir dos dados obtidos, foram calculados:

(i) Ganho de massa corporal (em g) durante o tratamento (peso ao final do tratamento – peso no dia de início do tratamento).

(ii) Ingestão hídrica durante o tratamento (consumo médio diário de água durante o período de tratamento, expresso como mL de água/dia).

(iii) Energia ingerida durante o tratamento (soma da energia ingerida durante os 19 dias do tratamento, considerando a quantidade de energia, em kJ, por g de dieta, dividida por 19), expressa como kJ/dia.

(iv) Eficiência metabólica (ganho de massa corporal dividido pelo consumo de energia em kJ durante o tratamento), expressa em g/kJ.

(iv) Massa (em g) dos depósitos de tecido adiposo branco visceral (epididimal e retroperitoneal), branco subcutâneo (inguinal) e marrom (interscapular).

A glicemia foi aferida no período da manhã, após jejum noturno de 12 horas em animais na 12^a, 17^a e 20^a semanas de vida, com a utilização de tiras reativas (Accuchek Performa, Roche, USA) e glicosímetro (Accuchek Performa, Roche, USA), com limite de detecção entre 10 e 600 mg/dL.

Ao final do estudo, todos os animais foram eutanasiados por meio de decapitação, no período matutino e o sangue do tronco foi coletado, centrifugado (4000 g durante 15 minutos a 4° C) e o soro armazenado a -80° C, para posterior medida da concentração de enzimas hepáticas e avaliação do perfil lipídico.

Foram também dissecados os depósitos de tecido adiposo branco visceral (epididimal e retroperitoneal), branco subcutâneo (inguinal) e marrom (interescapular), além de amostras do fígado. Depois desse procedimento, suas massas foram aferidas e fragmentos do fígado foram fixados em paraformaldeído 4% e embebidos em parafina para posterior análise histológica, com coloração com hematoxilina e eosina.

5.8 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

A concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), triglicerídeos e HDL colesterol (HDL-c) foi analisada por método enzimático utilizando kits de ensaio (OSR6009, OSR6107, OSR6116, OSR60118, respectivamente), de acordo com as instruções do fabricante, em analisador químico automático (Beckman Coulter, Inc., Brea, USA).

5.9 TESTE DE TOLERÂNCIA A GLICOSE

O teste de tolerância a glicose (GTT) foi realizado na última semana de tratamento com o extrato *Rynchelytrum repens*, rosiglitazona ou veículo, em animais submetidos a jejum diurno de 6 horas, sem restrição à água. Após o período de jejum, foi coletada uma gota de sangue para determinação da glicemia basal (tempo zero) e em seguida os animais receberam uma dose única de solução de glicose (1 g/kg de peso corporal) por injeção via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda do animal foram coletadas após 15, 30, 60 e 120 minutos da injeção de glicose e analisadas em glicosímetro (Accucheck Performa, Roche, USA).

5.10 ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

5.10.1 Fixação do tecido hepático

Fragmentos do fígado foram imediatamente armazenados em tubos cônicos contendo solução fixadora (paraformaldeído 4% v/v, recém-preparada) por até 24 h. Em seguida, foram transferidos para outra solução fixadora, Bouin (75 mL de ácido pícrico, 25 mL de formol, 5 mL de ácido acético) por 4 h, lavados várias vezes em solução de álcool etílico 50% (v/v) e depois conservados em álcool etílico 70% (v/v) até o seu processamento.

5.10.2 Inclusão em parafina

Para a realização do processo inclusão, fragmentos de tecido mantidos no álcool etílico 70% foram transferidos para uma caixeta de metal perfurada. Este processo de inclusão do tecido na parafina foi realizado manualmente, como descrito a seguir. Inicialmente os cortes de tecidos conservados foram submetidos a desidratação em álcoois em concentrações progressivas (álcool 70% - v/v, álcool 95% e álcool absoluto [2 banhos]) e diafanização por imersão em solução de álcool absoluto e xilol (v/v) e, por último, foram imersos por uma hora em parafina (Paraplast, Leica Biosystems, Alemanha) fundida na estufa (60°C). Para isso, os cortes de tecidos foram fixados na posição vertical e no fundo da forma, com o auxílio de uma pinça pré-aquecida.

O material parafinado foi mantido em temperatura ambiente até a realização de cortes de tecido no micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha).

5.10.3 Corte no micrótomo

Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram durante 30 minutos a -20°C antes da microtomia, para evitar enrugamento do tecido durante o corte. Os blocos foram cortados em micrótomo (Rotary microtome, modelo RM2125, Leica Biosystems, Alemanha) em espessura de 5 µm e os fragmentos obtidos foram transferidos para banho-maria (40°C), distendidos com o auxílio de uma pinça e

aderidos em lâminas. As lâminas foram transferidas para estufa a 60°C por aproximadamente 2 horas e depois armazenadas em temperatura ambiente.

5.10.4 Coloração com hematoxilina-eosina

As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina. Para a realização desta etapa, elas foram imersas em xilol (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico absoluto (3 banhos por 2 minutos), álcool etílico a 95% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 80% (1 banho por 2 minutos), álcool etílico a 75% (1 banho por 2 minutos), lavadas em água corrente, lavadas em água destilada por 3 minutos e imersas em solução de hematoxilina de Harris por 1 minuto (5 mg hematoxilina, 50 mL de álcool absoluto, 100 mg de alúmen de potássio, 2,5 g de óxido vermelho de mercúrio, 1000 mL de água destilada). Posteriormente as lâminas foram lavadas em água corrente até tirar o excesso de hematoxilina, imersas em ácido clorídrico (1 mL) e álcool a 70% (v/v) e novamente lavadas em água corrente.

Para imersão em eosina, as lâminas foram inicialmente imersas em solução Scott, lavadas em água corrente, lavadas em água destilada, imersas em álcool etílico a 80% (3 banhos) álcool etílico a 95%, álcool etílico absoluto (2 banhos) e imersas em eosina (1 g de eosina em 100 mL de água destilada) por 1 minuto. Para finalização do processo de coloração, as lâminas foram imersas em solução de álcool etílico a 95%, álcool etílico a 100% (2 banhos) e em xilol (2 banhos de 3 minutos).

Para fixação das lamínulas, as lâminas foram cuidadosamente secas com papel absorvente e receberam uma gota de resina líquida Entellan (Entellan new, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sobre o corte histológico. As imagens dos cortes de tecidos foram capturadas por uma câmara digital acoplada a um microscópio de luz (Axio imager A1, Zeiss Inc., Jena, Alemanha) com aumento de 10 vezes.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no programa estatístico *Graph Pad Prism 5.0*. Todos os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O teste t de Student não pareado ou a análise de variância de um fator (one way ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Keuls foram usados para comparar as

médias entre dois ou múltiplos grupos, respectivamente. O nível de significância adotado foi o valor $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 GANHO DE MASSA CORPORAL E HIPERGLICEMIA INDUZIDAS POR DIETA HIPERLIPÍDICA

Na 5^a semana de vida, os camundongos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, um contendo 4 animais e o outro, 16. Neste momento, não foi observada diferença entre os grupos com relação à massa corporal (Figura 4A). A partir deste período, um grupo foi alimentado com dieta controle (n = 4) e os outros 4 grupos, com DHL (n = 16). A partir da 16^a semana de vida, após 11 semanas de administração de DHL, observou-se aumento significativo da massa corporal nos grupos de camundongos alimentados com DHL em relação ao grupo alimentado com dieta controle (Figura 4B). Ao final da 16^a semana de vida, antes do início do tratamento com extrato de *R. repens*, rosiglitazona ou veículo, os animais alimentados com DHL apresentaram ganho cumulativo de massa corporal, desde a 5^a semana de vida, superior ao do grupo em dieta controle (Figura 4C).

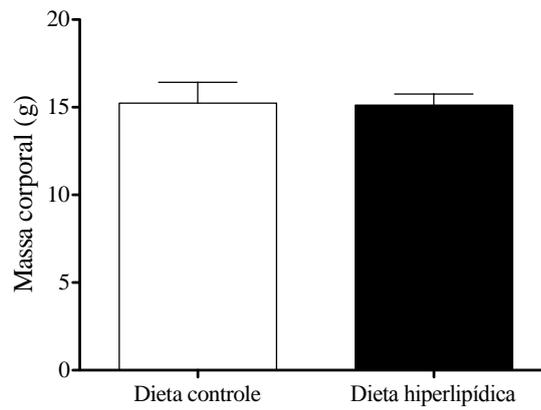
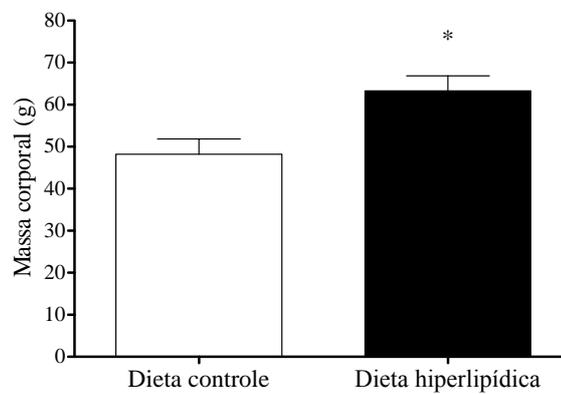
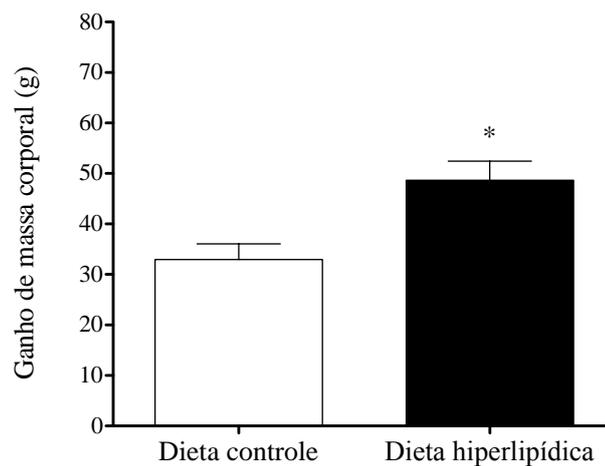
A**B****C**

Figura 4. Massa corporal de camundongos Swiss alimentados com dieta controle ou dieta hiperlipídica. **(A)** Massa corporal na 5^a semana de vida, antes da randomização em grupos para receber dieta controle ou hiperlipídica, **(B)** Massa corporal na 16^a semana de vida, após 11 semanas da administração de dieta hiperlipídica, e **(C)** Ganho de massa corporal da 5^a à 16^a semana de vida. Camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou DHL (n = 16), a partir da 5^a semana de vida. Dados apresentados como média ± EPM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (Teste t de Student não pareado).

A partir da 12^a semana de vida, os camundongos alimentados com DHL, apresentaram um aumento da glicemia em jejum em relação aos camundongos que receberam dieta controle ($114,0 \pm 3,8$ mg/dL *versus* $73,8 \pm 6,1$ mg/dL, respectivamente), como apresentado na Figura 5A. Esta diferença foi ainda mais acentuada na 17^a semana de vida, antes do início do tratamento com diferentes doses do extrato *R. repens*, rosiglitazona ou veículo ($115,0 \pm 12,9$ mg/dL no grupo alimentado com dieta controle *versus* $147,9 \pm 5,5$ mg/dL no grupo alimentado com DHL, respectivamente, Figura 5B).

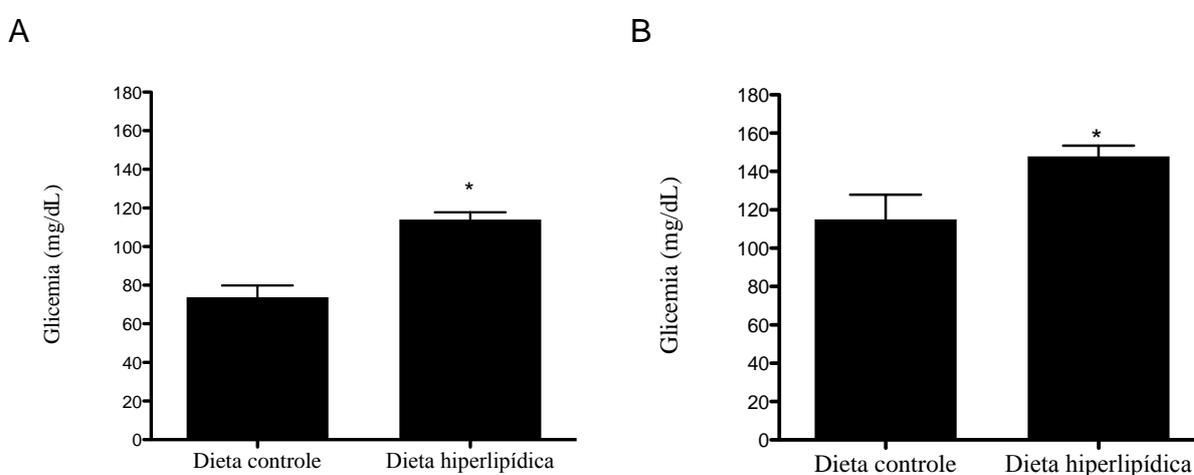


Figura 5. Hiperglicemia induzida pela dieta hiperlipídica. **(A)** Glicemia em jejum na 12^a semana de vida e **(B)** glicemia em jejum na 17^a semana de vida em camundongos alimentados com dieta controle (n = 4) ou DHL (n = 16), a partir da 5^a semana de vida. Dados apresentados como média ± EPM. * p < 0,05 vs. grupo alimentado com dieta controle (teste t de *Student* não pareado).

6.2 EFEITO DO EXTRATO *RYNCHELYTRUM REPENS* SOBRE O GANHO DE MASSA CORPORAL E TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os camundongos que receberam dieta controle foram tratados com veículo e os que receberam DHL foram divididos em 4 grupos, e cada um recebeu um dos seguintes tratamentos durante 19 dias: veículo (Tween-20 0,25%), rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou o extrato *R. repens* (50 ou 100 mg/kg/d). Depois deste período, foi observado aumento do ganho de massa corporal nos animais que receberam DHL e que foram tratados com rosiglitazona, em comparação com os animais que receberam dieta controle ou DHL e veículo. Foi observada tendência de redução da

massa corporal dos animais alimentados com DHL e tratados com diferentes doses (50 e 100 mg/kg/d) do extrato de *R. repens* em relação aos alimentados com DHL e tratados com veículo, porém esta diferença não foi significativa (Figura 6).

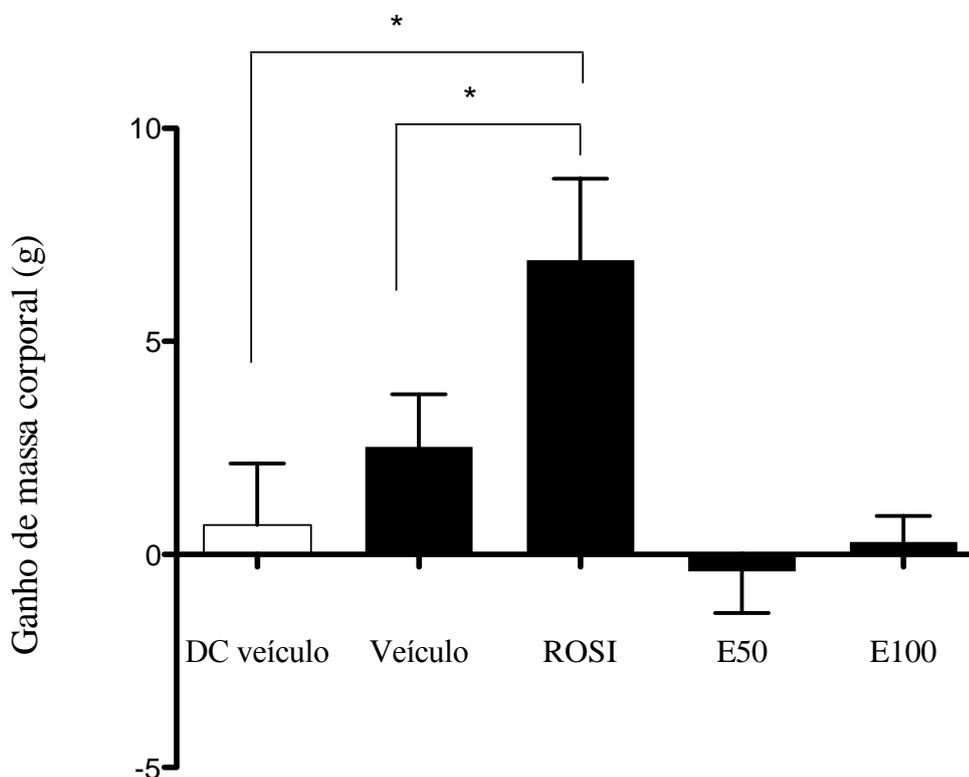


Figura 6. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre o ganho de massa corporal. Ganho de massa corporal após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou extrato *Rynchelytrum repens* (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ por análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*. $n = 4$ camundongos por grupo. DC: dieta controle; ROSI: rosiglitazona 4 mg/kg/d; E50: extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100: extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

Com o intuito de avaliar o efeito do extrato de *R. repens* sobre a hiperglicemia induzida pela DHL, foi realizado o teste de tolerância à glicose na última semana de tratamento, após jejum diurno de 6 horas, sem restrição à água. Após sobrecarga de glicose (injeção de glicose, na dose de 1 g/kg de massa corporal, por via intraperitoneal), foi observada tendência de comprometimento da tolerância à glicose nos animais alimentados com DHL e tratados com veículo, em relação aos animais alimentados com dieta controle e tratados com veículo (Figura 7). O tratamento com o extrato de *R. repens*, em ambas as doses testadas (50 ou 100 mg/kg/d), resultou em tendência de melhora da tolerância à glicose nos animais alimentados com DHL

em relação aos animais alimentados com DHL e tratados com veículo, embora de forma não significativa. A resposta observada nos animais tratados com o extrato foi semelhante à dos animais alimentados com DHL e tratados com rosiglitazona, um anti-hiperglicemiante utilizado como controle positivo, e à dos animais que receberam dieta controle e foram tratados com veículo (Tabela 1 e Figura 7).

A área sob a curva do gráfico tempo x glicemia após a administração de sobrecarga intraperitoneal de glicose foi maior nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo, em relação à dos animais que receberam dieta controle e veículo. Nos animais que receberam DHL e foram tratados com o extrato de *R. repens* (50 ou 100 mg/kg/d) ou rosiglitazona, o valor da área sob a curva foi semelhante ao dos animais que receberam dieta controle e foram tratados com veículo. Estas diferenças, entretanto, não foram estatisticamente significativas (dados não mostrados).

Tabela 1 - Glicemia (média \pm desvio-padrão) basal e após sobrecarga intraperitoneal de glicose em camundongos alimentados com dieta controle e tratados com veículo e camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, rosiglitazona ou extrato de *R. repens*.

Tempo (min)	DC, veículo (n=4)	DHL, veículo (n=4)	DHL, ROSI (n=5)	DHL, EC 50 (n=5)	DHL, EC100 (n=5)
0	145,3 \pm 15,2 ^a	194,0 \pm 30,6 ^a	150,5 \pm 22,6 ^a	142,8 \pm 23,6 ^a	148,0 \pm 14,1 ^a
15	253,8 \pm 33,9 ^a	323,0 \pm 103,1 ^a	306,5 \pm 50,6 ^a	289,4 \pm 34,5 ^a	293,3 \pm 44,7 ^a
30	269,8 \pm 21,6 ^a	317,6 \pm 154,0 ^a	309,0 \pm 58,1 ^a	268,0 \pm 54,2 ^a	275,8 \pm 43,1 ^a
60	200,3 \pm 16,5 ^a	263,2 \pm 149,5 ^a	212,3 \pm 20,5 ^a	193,4 \pm 27,5 ^a	194,0 \pm 45,8 ^a
90	163,3 \pm 17,8 ^a	223,8 \pm 117,1 ^a	176,3 \pm 20,9 ^a	172,0 \pm 13,4 ^a	163,3 \pm 16,9 ^a
120	118,0 \pm 7,0 ^a	159,0 \pm 16,2 ^b	131,5 \pm 21,3 ^a	118,2 \pm 12,8 ^a	128,8 \pm 13,6 ^a

A análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de *Newman-Keuls* foi realizada para comparação entre os grupos, em cada período de tempo do teste de tolerância à glicose. Para cada período de tempo, os grupos identificados com letras diferentes apresentam glicemia média estatisticamente diferente ($p < 0,05$) e os grupos identificadas com a mesma letra, glicemia média estatisticamente semelhante.

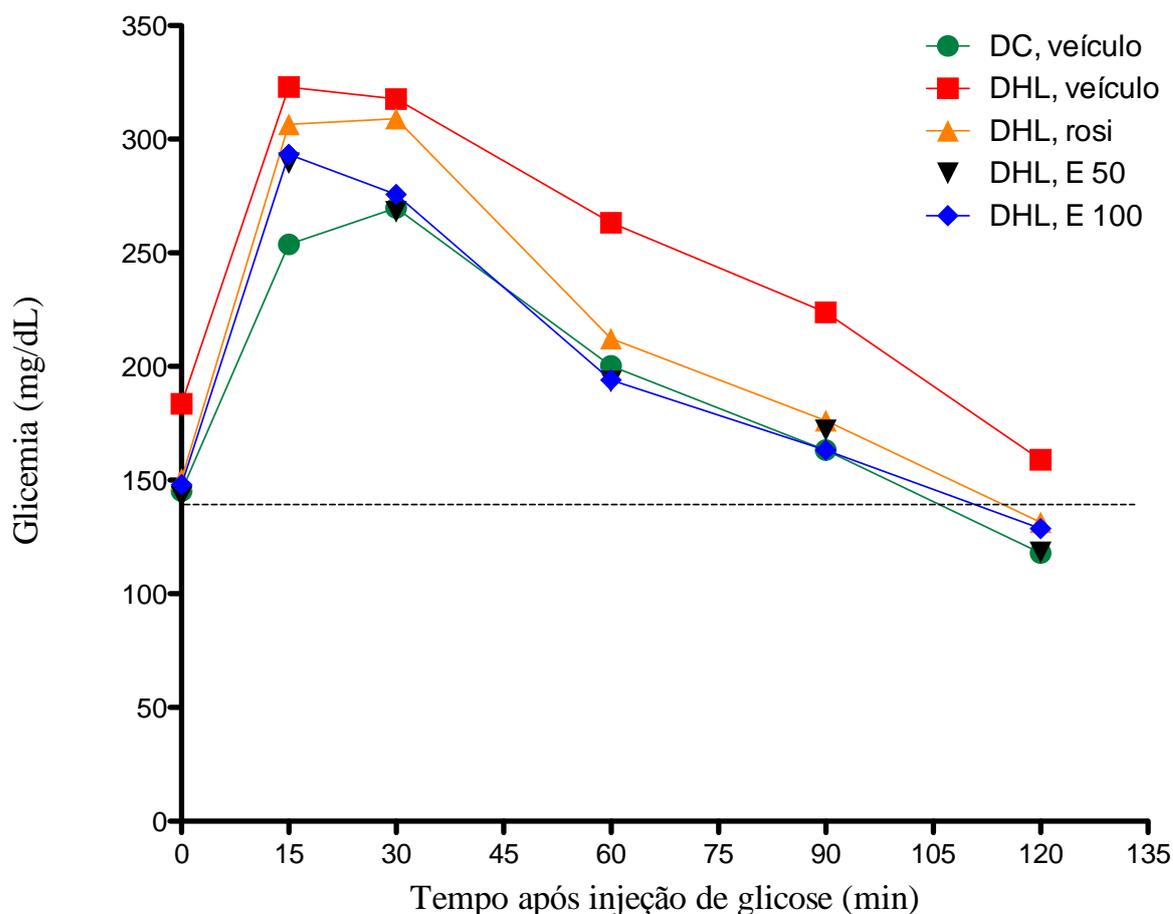


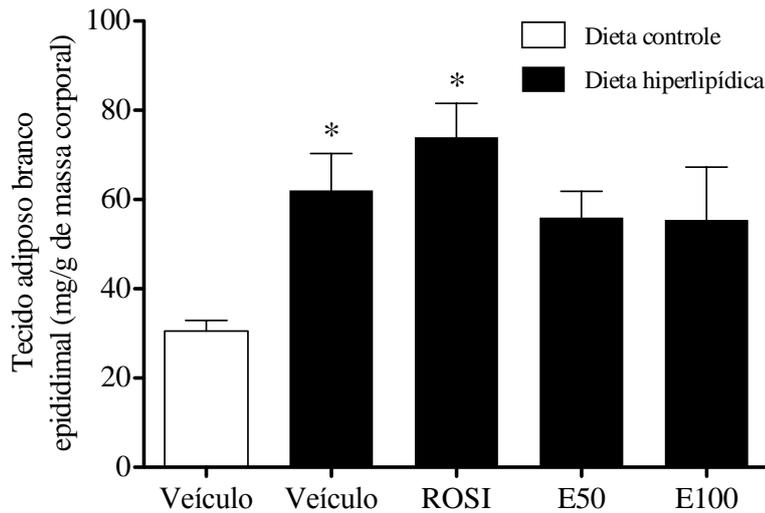
Figura 7. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre a tolerância à glicose. Glicemia 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de sobrecarga intraperitoneal de glicose após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou extrato *Rynchelytrum repens* (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média. A linha pontilhada representa o ponto de corte acima do qual a glicemia 120 minutos após sobrecarga de glicose indica intolerância à glicose. ROSI, rosiglitazona; E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

6.3 EFEITO DO EXTRATO *RYNCHELYTRUM REPENS* SOBRE A ADIPOSIDADE, INGESTÃO HÍDRICA E DE ENERGIA

Os camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo ou rosiglitazona apresentaram aumento da massa adiposa epididimal e retroperitoneal (depósito visceral) em relação aos alimentados com dieta controle (Figuras 8A e 8B). No grupo tratado com a maior dose de extrato (100 mg/kg/d), foi observada redução significativa da massa adiposa retroperitoneal (depósito visceral), para valores médios semelhantes aos observados nos animais que receberam dieta controle

(Figura 8B). Foi observada também redução da massa adiposa visceral retroperitoneal nos camundongos tratados com 100 mg/kg/d do extrato de *R. repens* em relação aos animais alimentados com DHL e tratados com veículo, porém inalteração da massa adiposa epididimal dos camundongos tratados com 50 ou 100 mg/kg/d do extrato (Figuras 8A e 8B).

A



B

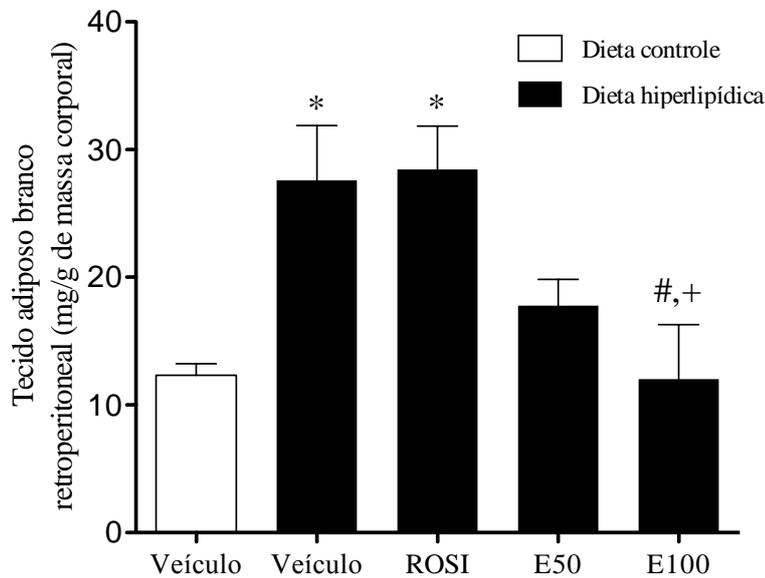
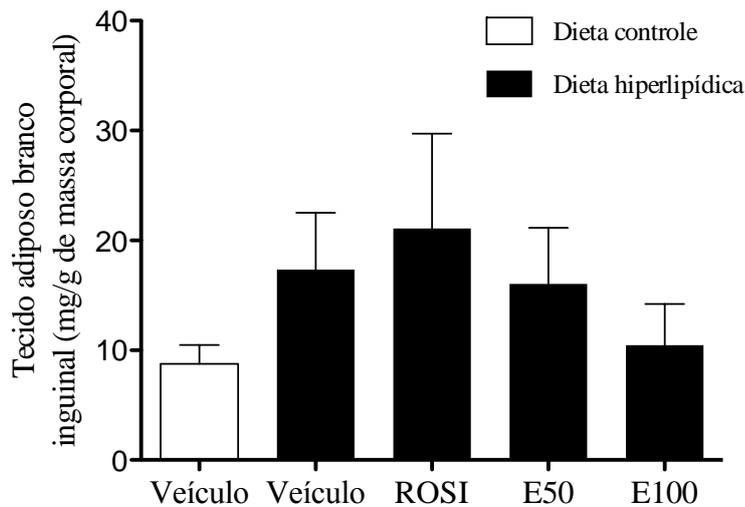


Figura 8. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre adiposidade visceral. (A) Massa de tecido adiposo branco epididimal e (B) massa de tecido adiposo branco retroperitoneal, corrigida para a massa corporal total, após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou extrato (50 ou 100 m/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL tratado com veículo, + $p < 0,05$ vs. ROSI (Análise de variância - ANOVA – seguida de pós-teste de Newman-Keuls). $n = 4$ camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

A massa do tecido adiposo branco inguinal (depósito subcutâneo) e também do tecido adiposo marrom interescapular não apresentou diferença significativa entre os grupos. Entretanto, foi observada tendência de diminuição desses depósitos em resposta ao tratamento com as duas doses testadas do extrato de *R. repens* e de aumento em resposta ao tratamento com rosiglitazona (Figuras 9A e 9B).

A



B

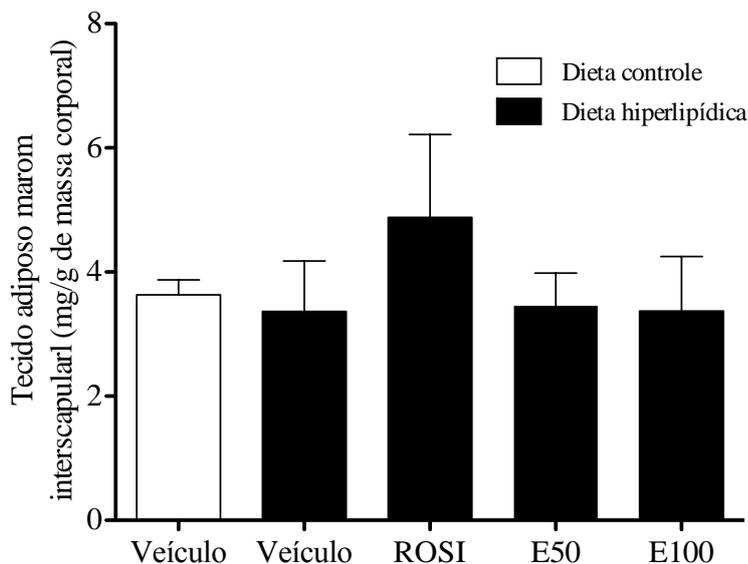
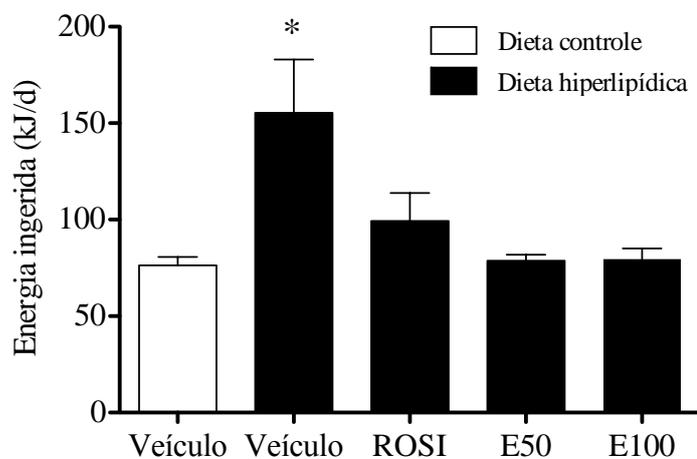


Figura 9. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre a massa de tecido adiposo (A) branco subcutâneo (inguinal) e (B) marrom interescapular, corrigidas para a massa corporal total, após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (ROSI) ou extrato (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. n = 4 camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

Após 19 dias de tratamento, foi observado aumento da ingestão de energia nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo em comparação aos demais grupos (Figura 10A). Não houve influência do tratamento com rosiglitazona ou extrato de *R. repens* sobre a ingestão de energia, em animais alimentados com DHL (Figura 10A).

Para avaliar a relação entre o ganho de massa corporal e a ingestão de energia, em resposta aos diferentes tratamentos, foi calculada a eficiência metabólica. Foi observada tendência de aumento da eficiência metabólica dos camundongos alimentados com DHL e tratados com rosiglitazona e de diminuição desta variável em resposta ao tratamento com extrato de *R. repens*, quando comparados aos grupos alimentados com DHL e tratados com veículo. Entretanto, a diferença só foi significativa quando se compararam os grupos alimentados com DHL e tratados com rosiglitazona ou o extrato de *R. repens* na dose de 50 mg/kg/d (Figura 10B).

A



B

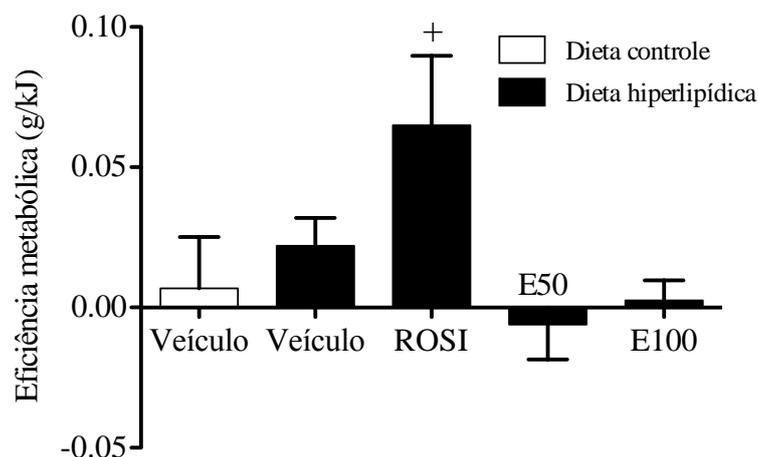


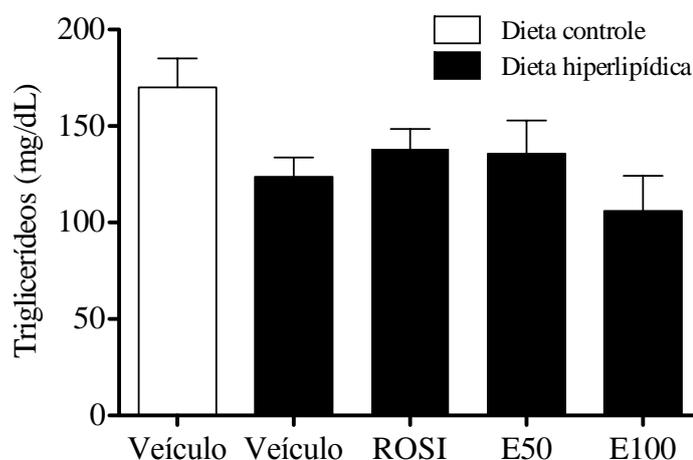
Figura 10. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre (A) a energia ingerida e (B) a eficiência metabólica após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (ROSI) ou extrato (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. todos os grupos, + $p < 0,05$ vs. DHL tratado com extrato na dose 50 mg/kg/d (Análise de variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*). $n = 4$ camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

Não foi observada modificação da ingestão hídrica em resposta a nenhum dos tratamentos, nos camundongos estudados (dieta controle: $10,0 \pm 0,7$ mL/d, DHL+veículo: $11,1 \pm 1,2$ mL/d, DHL+ROSI: $9,1 \pm 0,7$ mL/d, DHL+E50: $9,8 \pm 0,76$ mL/d, DHL+E100: $10,2 \pm 0,9$ mL/d; $p < 0,05$ por análise de variância - ANOVA).

6.4 EFEITO DO EXTRATO *RYNCHELYTRUM REPENS* SOBRE O PERFIL LIPÍDICO E CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ENZIMAS HEPÁTICAS

Após 19 dias de tratamento, não foi observada nenhuma alteração da concentração sérica de triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol) entre os grupos estudados (Figuras 11A e 11B).

A



B

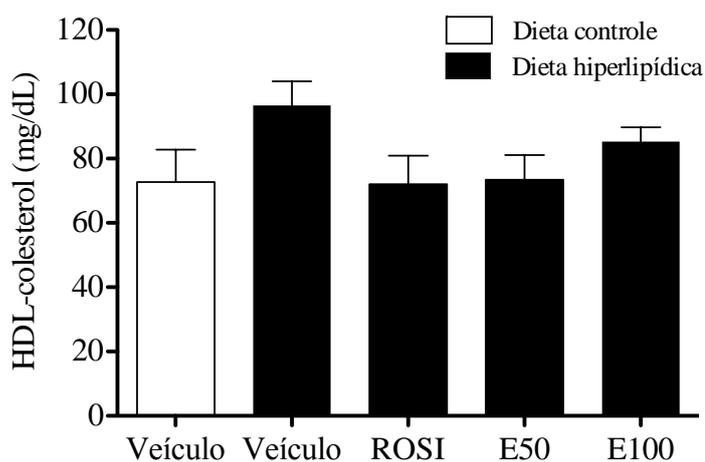
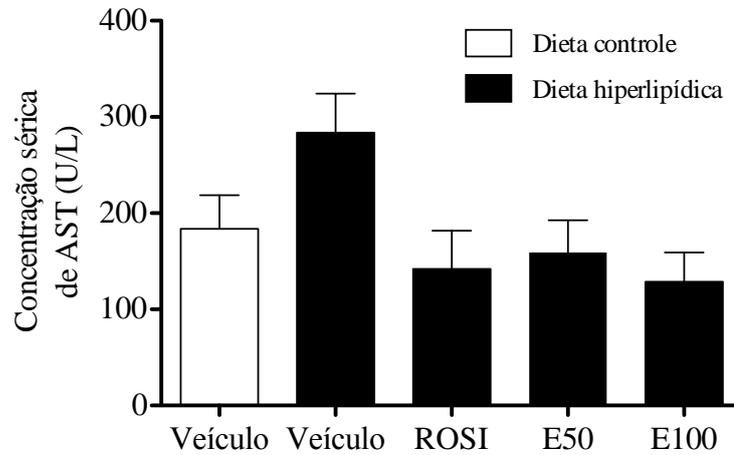


Figura 11. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre o perfil lipídico. (A) Concentração sérica de triglicerídeos e (B) concentração sérica de HDL-colesterol após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou extrato (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. n = 4 camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

A concentração sérica da transaminase aspartato aminotransferase (AST) não foi diferente entre os grupos, em resposta aos tratamentos (Figura 12A), embora tenha sido observada tendência de diminuição desta variável no grupo tratado com rosiglitazona ou extrato de *R. repens* (50 ou 100 m/kg/d). Foi observado aumento da concentração sérica da transaminase alanina aminotransferase (ALT), em resposta à DHL, nos camundongos tratados com veículo em comparação com os que receberam dieta controle (Figura 12B). O tratamento com extrato de *R. repens* ou rosiglitazona foi capaz de reduzir a concentração sérica dessa enzima hepática, nos animais que receberam DHL, para valores médios semelhantes aos observados nos animais em dieta controle (Figura 12B).

A



B

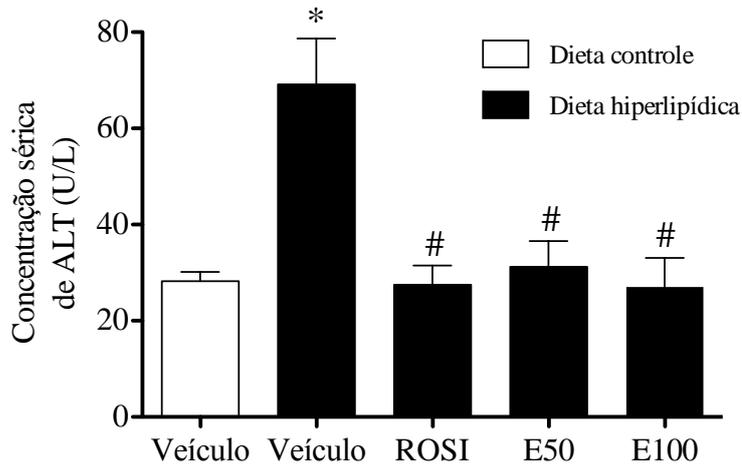


Figura 12. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre enzimas hepáticas. **(A)** Concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST) e **(B)** de alanina aminotransferase (ALT) após 19 dias de tratamento com veículo, rosiglitazona (4 mg/kg/d) ou extrato (50 ou 100 mg/kg/d), nos camundongos alimentados com dieta controle ou DHL, a partir da 5ª semana de vida. Dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. dieta controle, # $p < 0,05$ vs. DHL tratado com veículo (análise de variância - ANOVA – seguida de pós-teste de *Newman-Keuls*) $n = 4$ camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

6.5 EFEITO DO EXTRATO *RYNCHELYTRUM REPENS* SOBRE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DO FÍGADO

Nos camundongos alimentados com DHL e tratados com veículo ou rosiglitazona foi observado aumento do acúmulo de lipídeos no fígado, caracterizado pela presença de gotículas lipídicas no tecido, quando comparado aos alimentados

com dieta controle e tratados com veículo (Figuras 13A-C). O tratamento com as duas doses testadas (50 e 100 mg/kg/d) do extrato de *R. repens* reduziu este acúmulo (Figuras 13D e 13E).

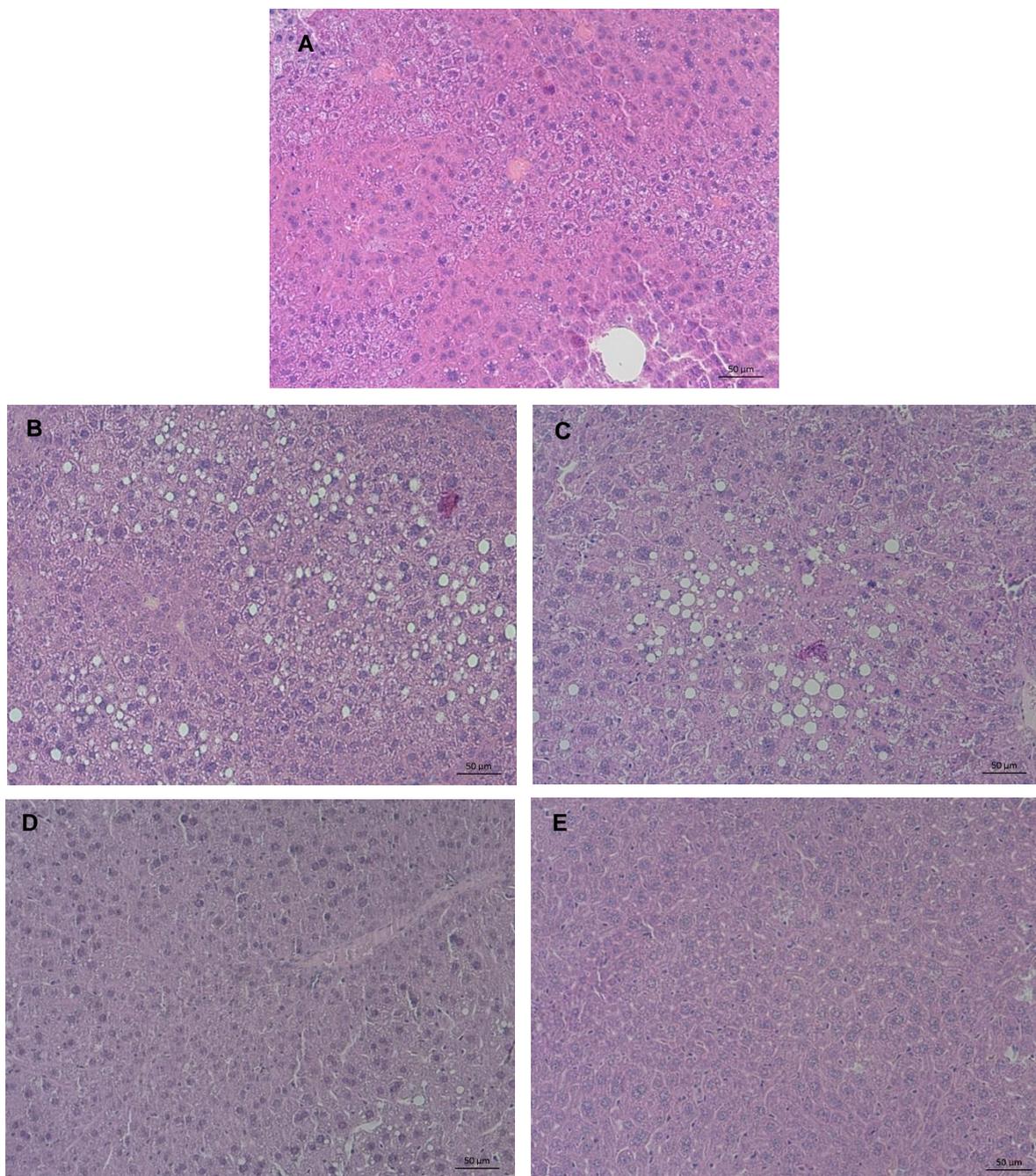


Figura 13. Efeito do extrato *Rynchelytrum repens* sobre características histológicas do fígado. Amostras de tecido hepático coradas com hematoxilina e eosina, de um camundongo representativo de cada grupo; (A) dieta controle, (B) DHL + veículo, (C) DHL + rosiglitazona (4 mg/kg/d), (D) DHL + extrato de *R. repens* (50 mg/kg/d) e (E) DHL + extrato (100 mg/kg/d). Imagens mostradas com aumento de 10 vezes e escala de 50 µm. n = 4 camundongos por grupo. E50, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 50 mg/kg/d; E100, extrato *Rynchelytrum repens* na dose de 100 mg/kg/d.

7 DISCUSSÃO

As doenças crônicas não transmissíveis representam hoje grave problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil. Entre essas doenças, destaca-se o DM2, importante determinante de morbidade e de mortalidade (1). O número de casos da doença no mundo, em 2013, foi estimado em 387 milhões, com perspectiva de aumento para 592 milhões em 2035 (1). O Brasil ocupa a quarta posição em prevalência do DM2, atrás somente da China, Índia e Estados Unidos da América, com cerca de 11 milhões de casos da doença (1).

A abordagem terapêutica desta condição é multifatorial e inclui mudanças do estilo de vida, como hábitos alimentares saudáveis e atividade física, assim como tratamento farmacológico. Este, por sua vez, é direcionado não apenas ao controle glicêmico, mas também aos outros distúrbios que frequentemente acompanham o DM2, incluindo a hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade e doenças cardiovasculares (2).

Este cenário epidemiológico e terapêutico se reflete na grande movimentação de recursos financeiros pela indústria farmacêutica, inclusive no Brasil, que, em 2011, ocupava a décima posição no mercado farmacêutico mundial, com a perspectiva de ocupar a quinta posição a partir de 2015 (89). Em concordância, a indústria de produtos farmacêuticos e medicinais no País movimenta em torno de 10 bilhões de dólares ao ano e, apesar destes números, pouco tem sido investido no desenvolvimento de novos medicamentos sintéticos para tratamento destas doenças (90).

Neste contexto, os produtos naturais vêm sendo valorizados como fonte para desenvolvimento de novos medicamentos (91–93). Nas últimas décadas, cerca de 47% dos medicamentos para tratamento de doenças neoplásicas foram originados diretamente ou derivados de produtos naturais, ao passo que somente 30% dos novos medicamentos foram de origem puramente sintética (91).

As plantas medicinais são utilizadas para tratamento do diabetes desde a antiguidade e também atualmente, sobretudo entre populações em situação econômica desfavorável, devido ao seu baixo custo. Embora o efeito anti-hiperglicemiante de diversas preparações de plantas seja bem descrito na prática clínica, poucos foram os estudos científicos desenhados para determinar sua efetividade e segurança em modelos animais e em humanos (94).

O presente estudo teve como objetivo analisar o efeito do extrato da *R. repens* em um modelo murino de hiperglicemia e obesidade induzidos por dieta hiperlipídica. A atividade anti-hiperglicemiante de extrato desta planta foi previamente descrita em um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (7,8). A estreptozotocina é um derivado da nitrosamina com atividade altamente citotóxica nas células beta pancreáticas (95), de modo que o diabetes resultante se assemelha mais ao DM1, caracterizado por deficiência completa de insulina, que ao DM2, a forma mais prevalente e associada a resistência insulínica e deficiência secretória da célula beta (3). O modelo utilizado no presente estudo, de hiperglicemia e obesidade induzidos por dieta hiperlipídica, é caracterizado por resistência à ação da insulina (96) e, assim, assemelha-se ao DM2.

Após o desmame e ambientação ao biotério, os camundongos Swiss machos utilizados no presente estudo foram aleatorizados para receber dieta controle ou dieta hiperlipídica. Como esperado, a dieta hiperlipídica induziu aumento do peso corporal. Na 12^a semana de vida, após 7 semanas de dieta hiperlipídica, foi observado aumento da glicemia em jejum para valores compatíveis com glicemia de jejum alterada (ou pré-diabetes, entre 100 e 126 mg/dL) e, a partir da 17^a semana de vida, após 12 semanas de dieta hiperlipídica, hiperglicemia compatível com diabetes (valores médios de glicemia acima de 126 mg/dL) (3). Estes dados, em conjunto, indicaram a adequação do modelo animal a ser estudado.

Após indução de hiperglicemia, os animais alimentados com dieta hiperlipídica foram aleatorizados para receber veículo (controle negativo), rosiglitazona (anti-hiperglicemiante com atividade estabelecida, utilizado como controle positivo na dose de 4 mg/kg/d, via intraperitoneal) ou duas diferentes doses do extrato de *R. repens* (50 ou 100 mg/kg/d, via intraperitoneal) durante 19 dias. Como esperado, o tratamento com rosiglitazona induziu ganho de peso (97), ao passo que os camundongos tratados com as duas doses testadas do extrato de *R. repens* apresentaram tendência de redução do ganho de peso induzido pela dieta hiperlipídica.

O efeito dos anti-hiperglicemiantes sobre o peso corporal é uma característica importante a ser analisada no tratamento do DM2, que frequentemente associa-se à obesidade. Além disso, a obesidade, especialmente visceral, associa-se a piora da resistência insulínica e, assim, do controle glicêmico (55). Os anti-hiperglicemiantes atualmente empregados no tratamento do DM2 são classificados, de acordo seus

efeitos sobre o peso corporal, em neutros, indutores de ganho ponderal e indutores de perda ponderal (4). Entre os medicamentos que induzem perda ponderal, estão apenas os análogos do peptídeo 1 semelhante ao glucagon (*glucagon-like peptide 1*), um peptídeo secretado por células L na mucosa intestinal e que estimulam a secreção de insulina em resposta à glicose, e os análogos da amilina (um peptídeo co-secretado com a insulina que reduz a produção de glucagon). A existência de número limitado de medicamentos capazes de simultaneamente tratar a hiperglicemia e a obesidade resulta em grande interesse por substâncias com este perfil. Embora o efeito do extrato de *R. repens* sobre o ganho ponderal induzido por dieta hiperlipídica não tenha sido significativo, após tratamento durante 19 dias, é possível que este efeito fosse observado no decorrer de tratamento mais prolongado.

Embora o achado de menor ganho de peso dos animais tratados com o extrato de *R. repens* represente efeito potencialmente benéfico, é importante considerar os mecanismos envolvidos neste achado, em especial diferenciar se representa resultado de toxicidade do extrato ou efeito positivo primário sobre a homeostase metabólica. O achado simultâneo de redução do consumo de dieta poderia sugerir efeito tóxico. Entretanto, ainda que o estudo não tenha sido desenhado para avaliar os efeitos tóxicos do extrato, alguns dados indicam que não tenha havido toxicidade, entre eles a inalteração do consumo hídrico, em relação aos animais tratados com veículo, a redução da concentração sérica das enzimas hepáticas AST e ALT e a ausência de alterações histológicas hepáticas.

Em relação à variável consumo de dieta, foi observado aumento no grupo alimentado com dieta hiperlipídica e tratado com veículo, em relação a todos os demais grupos, e não houve diferença do consumo de dieta nos animais alimentados com dieta controle (normolipídica) e tratados com veículo e aqueles alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com rosiglitazona ou o extrato de *R. repens*. O efeito da dieta hiperlipídica em induzir aumento do consumo de energia é bem estabelecido e está relacionado a ação deste padrão alimentar em determinar resistência à ação da insulina no hipotálamo (98). A ação central da insulina, em condições fisiológicas, resulta em redução do apetite (99) e isso explica o efeito da resistência insulínica hipotalâmica em promover hiperfagia. A rosiglitazona também foi descrita como indutora de hiperfagia em roedores (100,101), efeito que não foi verificado no presente estudo. Esta divergência pode ser devida às diferentes doses

utilizadas em um destes estudos, de 10 e 30 mg/kg/d (100) ou mesmo às diferentes linhagens de camundongos utilizadas (C56/Bl vs Swiss no presente estudo).

O ganho de peso em resposta ao tratamento com rosiglitazona ou extrato de *R. repens* foi correlacionado com o consumo de energia no período de tratamento, o que representa a eficiência metabólica, ou a capacidade de armazenar a energia ingerida. Nos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, o aumento das duas variáveis (ganho de peso e consumo alimentar) em relação ao grupo alimentado com dieta controle e tratado com veículo se traduziu em eficiência metabólica semelhante entre os dois grupos. Os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com rosiglitazona apresentaram tendência de aumento da eficiência metabólica ao passo que os que foram tratados com as duas doses do extrato apresentaram tendência de redução desta variável. Assim, ainda que tenham apresentado redução de ambos ganho de peso e consumo de dieta no período do tratamento, esta tendência de redução da eficiência metabólica poderia indicar redução da capacidade de armazenar energia na forma de gordura frente a determinado padrão de alimentação.

Para investigar o efeito do extrato de *R. repens* sobre a homeostase da glicose, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal. No período basal, antes da administração da sobrecarga de glicose, os animais tratados com rosiglitazona ou com as duas doses do extrato apresentaram glicemia semelhante aos dos animais alimentados com dieta controle e inferior à dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, embora esta última diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Após a administração da sobrecarga de glicose, os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com o extrato de *R. repens* apresentaram glicemia inferior à dos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo, embora esta diferença não tenha sido significativa. Embora não sejam definitivos, estes resultados apontam para o efeito anti-hiperglicemiante do extrato de *R. repens*, à semelhança do que foi observado anteriormente em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina (7,8).

O presente estudo não foi desenhado para investigar os mecanismos envolvidos no possível efeito anti-hiperglicemiante do extrato de *R. repens*. É importante destacar, contudo, que este extrato é rico no polissacarídeo beta-glucano, cujos efeitos metabólicos favoráveis foram previamente descritos. Os beta-glucanos são fibras solúveis cuja atividade anti-hiperglicemiante, assim como anti-

hiperlipemiante, é atribuída, em grande parte à sua interferência com a absorção intestinal de carboidratos e lipídeos (84). Este mecanismo, contudo, não poderia explicar os achados do presente estudo sobre a glicemia, uma vez que o extrato da *R. repens* foi administrado por via intraperitoneal. É possível que os efeitos positivos sobre a glicemia sejam decorrentes de outra característica já descrita dos beta-glucanos, que é sua atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (84,102). Esta hipótese é plausível considerando que a contribuição da resposta inflamatória na fisiopatologia da resistência insulínica e DM2 (103). É possível, ainda, que outras substâncias, não identificadas, sejam responsáveis por este efeito.

Em concordância com os dados sugestivos de efeitos favoráveis do extrato *R. repens* sobre a homeostase da glicose, os camundongos assim tratados apresentaram redução da massa adiposa visceral retroperitoneal em relação aos animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo. Este efeito sugere remodelamento favorável do tecido adiposo, com potenciais efeitos benéficos sobre a tolerância à glicose, como observado no presente estudo, assim como sobre a sensibilidade à insulina (104), não avaliada no presente estudo. A redução da resistência insulínica associada à obesidade frequentemente se associa a melhora do perfil lipídico, caracterizada por redução da concentração sérica de triglicerídeo a aumento da concentração sérica de colesterol HDL. Estes achados, contudo, não foram observados no presente estudo e é possível que os efeitos sobre o perfil lipídico ocorram após período mais prolongado de tratamento.

Foi observado, também, efeito favorável do extrato de *R. repens* sobre a esteatose hepática induzida pela dieta hiperlipídica. Os animais tratados com rosiglitazona apresentaram esteatose hepática, consistentemente com dados de estudos prévios envolvendo roedores (105–107). Os animais tratados com as duas doses do extrato de *R. repens*, 50 e 100 mg/kg/d, contudo, apresentaram redução do acúmulo lipídico hepático induzido pela dieta hiperlipídica. Considerando a associação entre esteatose hepática e resistência insulínica (108), este efeito poderia refletir também o efeito do extrato em promover melhora da sensibilidade à ação da insulina.

Em síntese, nossos resultados sugeriram o potencial anti-hiperglicemiante do extrato de *R. repens* em modelo murino de obesidade e hiperglicemia induzidas por dieta hiperlipídica, modelo mais semelhante ao DM2. Este efeito foi acompanhado de outros achados favoráveis, como redução do ganho de peso e da massa adiposa

visceral. Estudos adicionais são necessários para explorar o efeito de doses mais elevadas do extrato, seu perfil toxicológico e também as possíveis moléculas e mecanismos envolvidos neste efeito.

8 CONCLUSÃO

No presente estudo, observou-se que camundongos Swiss machos alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com 50 ou 100 mg/kg/d de extrato de *Rynchelytrum repens* durante 19 dias apresentaram, em comparação com os animais alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com veículo:

- Redução do ganho de massa corporal em resposta à dieta hiperlipídica.
- Tendência não significativa de melhora da tolerância à glicose.
- Redução da massa adiposa visceral retroperitoneal e tendência de redução da massa adiposa visceral epididimal.
- Inalteração da massa adiposa subcutânea inguinal e marrom interescapular.
- Tendência de redução da ingestão de energia e da eficiência metabólica.
- Inalteração da ingestão hídrica.
- Inalteração da concentração sérica de triglicerídeo e lipoproteína da baixa densidade.
- Inalteração da concentração sérica de aspartato aminotransferase e redução da concentração sérica de alanina aminotransferase.
- Redução do acúmulo lipídico no fígado.

9 REFERÊNCIAS

1. Mena NA, Sea EA, Lucia S. IDF Diabetes Atlas - 2014 update. 2014.
2. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2015: Summary of Revisions. *Diabetes Care*. 2015; 38(Supplement_1):S4–S4.
3. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2015;38(Supplement_1):S8–16.
4. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: A patient-centered approach. Update to a position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetologia*. 2015;58(January):429–42.
5. Slavin SL. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*. 2008;108(10):1716–31.
6. Xavier F. The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes. *Diabetes Care*. 1997;20(11):1774.
7. De Paula a. CCFF, Sousa R V., Figueiredo-Riberio RCL, Buckeridge MS. Hypoglycemic activity of polysaccharide fractions containing β -glucans from extracts of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb., Poaceae. *Brazilian J Med Biol Res*. 2005;38(6):885–93.
8. Souza a, de Paula a CCFF, Figueiredo-Ribeiro RCL. Effects of irradiance on non-structural carbohydrates, growth, and hypoglycemic activity of *Rhynchelytrum repens* (Willd.) C.E. Hubb. (Poaceae). *Braz J Biol*. 2004;64(3B):697–706.
9. DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773–95.
10. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 2005;36(3):197–209.
11. Tabák AG, Jokela M, Akbaraly TN, Brunner EJ, Kivimäki M, Witte DR. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. *Lancet*. 2009;373(9682):2215–21.
12. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):881–5.
13. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PIW, Chen H, et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science*. 2007;316(5829):1331–6.
14. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science*. 2007;316(5829):1341–5.
15. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of Genome-Wide Association Signals in UK Samples Reveals Risk

- Loci for Type 2 Diabetes. *Science*. 2007;316(5829):1336–41.
16. Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2007 Jun;39(6):770–5.
 17. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2008 May;40(5):638–45.
 18. Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, et al. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1092–7.
 19. Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, Hara K, Horikoshi M, Andersen G, et al. SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet*. 2008 Sep;40(9):1098–102.
 20. Williams AL, Jacobs SBR, Moreno-Macias H, Huerta-Chagoya A, Churchhouse C, Marquez-Luna C, et al. Sequence variants in SLC16A11 are a common risk factor for type 2 diabetes in Mexico. *Nature*. 2014 Feb;506(7486):97–101.
 21. Chiu KC, Province MA, Permutt MA. Glucokinase gene is genetic marker for NIDDM in American blacks. *Diabetes*. 1992 Jul;41(7):843–9.
 22. Macfarlane WM, Frayling TM, Ellard S, Evans JC, Allen LI, Bulman MP, et al. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104(9):R33–9.
 23. Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, et al. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999 Nov;104(9):R41–8.
 24. Rosengren AH, Jokubka R, Tojjar D, Granhall C, Hansson O, Li D-Q, et al. Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science*. 2010 Jan;327(5962):217–20.
 25. Gribble FM. Alpha2A-adrenergic receptors and type 2 diabetes. *N Engl J Med*; 2010 Jan;362(4):361–2.
 26. Ji L, Malecki M, Warram JH, Yang Y, Rich SS, Krolewski AS. New susceptibility locus for NIDDM is localized to human chromosome 20q. *Diabetes*. 1997 May;46(5):876–81.
 27. Mahtani MM, Widen E, Lehto M, Thomas J, McCarthy M, Brayer J, et al. Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nat Genet*. 1996 Sep;14(1):90–4.
 28. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, et al. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med*. 1995 Aug;333(6):343–7.
 29. Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med*. 1995 Aug;333(6):348–51.
 30. Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B,

- et al. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet.* 1996 Jun;13(2):161–6.
31. Horikawa Y, Oda N, Cox NJ, Li X, Orho-Melander M, Hara M, et al. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet.* 2000 Oct;26(2):163–75.
 32. Hani EH, Hager J, Philippi A, Demenais F, Froguel P, Vionnet N. Mapping NIDDM susceptibility loci in French families: studies with markers in the region of NIDDM1 on chromosome 2q. *Diabetes.* 1997 Jul;46(7):1225–6.
 33. Moller DE, Flier JS. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. *N Engl J Med.* 1991 Sep;325(13):938–48.
 34. McCulloch DK, Kahn SE, Schwartz MW, Koerker DJ, Palmer JP. Effect of nicotinic acid-induced insulin resistance on pancreatic B cell function in normal and streptozocin-treated baboons. *J Clin Invest.* 1991 Apr;87(4):1395–401.
 35. Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski MJ, Hayashi H, Ebina Y, et al. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet.* 1998 Nov;20(3):294–8.
 36. Engelgau MM, Geiss LS, Saaddine JB, Boyle JP, Benjamin SM, Gregg EW, et al. The evolving diabetes burden in the United States. *Ann Intern Med.* 2004 Jun;140(11):945–50.
 37. Sullivan PW, Morrato EH, Ghushchyan V, Wyatt HR, Hill JO. Obesity, inactivity, and the prevalence of diabetes and diabetes-related cardiovascular comorbidities in the U.S., 2000-2002. *Diabetes Care.* 2005 Jul;28(7):1599–603.
 38. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991 Mar;14(3):173–94.
 39. Friedman JE, Dohm GL, Leggett-Frazier N, Elton CW, Tapscott EB, Pories WP, et al. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest.* 1992 Feb;89(2):701–5.
 40. Henry RR, Scheaffer L, Olefsky JM. Glycemic effects of intensive caloric restriction and isocaloric refeeding in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1985 Nov;61(5):917–25.
 41. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993 Jan;259(5091):87–91.
 42. Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science.* 1996 Nov;274(5291):1377–9.
 43. Hofmann C, Lorenz K, Braithwaite SS, Colca JR, Palazuk BJ, Hotamisligil GS, et al. Altered gene expression for tumor necrosis factor- α and its receptors during drug and dietary modulation of insulin resistance. *Endocrinology.* 1994

- Jan;134(1):264–70.
44. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. 1997 Oct;389(6651):610–4.
 45. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3015–25.
 46. Kanaya AM, Wassel Fyr C, Vittinghoff E, Harris TB, Park SW, Goodpaster BH, et al. Adipocytokines and incident diabetes mellitus in older adults: the independent effect of plasminogen activator inhibitor 1. *Arch Intern Med*. 2006 Feb;166(3):350–6.
 47. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001 Jan;409(6818):307–12.
 48. Graham TE, Yang Q, Bluher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med*. 2006 Jun;354(24):2552–63.
 49. Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 May;92(5):1886–90.
 50. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005 Jul;436(7049):356–62.
 51. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793–801.
 52. Vandanmagsar B, Youm Y-H, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):179–88.
 53. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard B V, Ravussin E. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. 1995 Oct;38(10):1213–7.
 54. Boden G, Chen X. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*. 1995 Sep;96(3):1261–8.
 55. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):875–80.
 56. Mantzoros CS, Li T, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug;90(8):4542–8.
 57. Li S, Shin HJ, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2009 Jul;302(2):179–88.
 58. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-

- derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med*. 2001 Aug;7(8):941–6.
59. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1784–92.
 60. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 May;86(5):1930–5.
 61. Andrews RC, Cooper AR, Montgomery AA, Norcross AJ, Peters TJ, Sharp DJ, et al. Diet or diet plus physical activity versus usual care in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: the Early ACTID randomised controlled trial. *Lancet* (London, England). 2011 Jul;378(9786):129–39.
 62. Umpierre D, Ribeiro PAB, Kramer CK, Leitao CB, Zucatti ATN, Azevedo MJ, et al. Physical activity advice only or structured exercise training and association with HbA1c levels in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2011 May;305(17):1790–9.
 63. Jeon CY, Lokken RP, Hu FB, van Dam RM. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetes Care*. 2007 Mar;30(3):744–52.
 64. Liu S, Willett WC. Dietary Carbohydrate. In: Pi-Sunyer FX, Lipman TO, editors. *UpToDate*. Waltham; 2015.
 65. Lattimer JM, Haub MD. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients*. 2010 Dec;2(12):1266–89.
 66. Jenkins DJ, Wolever TM, Taylor RH, Barker H, Fielden H, Baldwin JM, et al. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. *Am J Clin Nutr*. 1981 Mar;34(3):362–6.
 67. Wolever TM. The glycemic index: flogging a dead horse? *Diabetes Care*. 1997 Mar;20(3):452–6.
 68. Hollenbeck CB, Coulston AM, Reaven GM. Comparison of plasma glucose and insulin responses to mixed meals of high-, intermediate-, and low-glycemic potential. *Diabetes Care*. 1988 Apr;11(4):323–9.
 69. Wolever TMS, Vorster HH, Bjorck I, Brand-Miller J, Brighenti F, Mann JI, et al. Determination of the glycaemic index of foods: interlaboratory study. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Mar;57(3):475–82.
 70. Coulston AM, Hollenbeck CB, Swislocki AL, Reaven GM. Effect of source of dietary carbohydrate on plasma glucose and insulin responses to mixed meals in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*. 1987;10(4):395–400.
 71. Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, et al. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care*. 2014 Jan;37 Suppl 1:S120–43.
 72. Chan SMH, Ye J-M. Strategies for the discovery and development of anti-diabetic drugs from the natural products of traditional medicines. *J Pharm Pharm Sci*. 2013;16(2):207–16.

73. Tabatabaei-Malazy O, Larijani B, Abdollahi M. Targeting metabolic disorders by natural products. *J Diabetes Metab Disord*. 2015;14:57.
74. Astin JA. Why patients use alternative medicine: results of a national study. *JAMA*. 1998 May;279(19):1548–53.
75. Kelly JP, Kaufman DW, Kelley K, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent trends in use of herbal and other natural products. *Arch Intern Med*. 2005 Feb;165(3):281–6.
76. Pivello V, Shida C, Meirelles S. Alien grasses in Brazilian savannas. *Biodivers Conserv*. 1999;8:1281–94.
77. Fioravanti C, França E. Açúcar obtido do capim-favorito facilita a absorção de glicose e pode ajudar a controlar o diabetes. *Rev Pesqui FAPESP*. 2005;108:42–4.
78. Ribeiro A de O, Umemura GS, Sousa RV de, Oliveira FR de. Atividade Antidiabética e Efeitos Fisiológicos Associados aos β -Glucanos Presentes em *Rhynchelytrum repens*. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde*. 2009;11(3):41–50.
79. Anderson J, Akanji A. Treatment of diabetes with high fiber diet. In: Boca Raton F, editor. *Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition*. CRC Press; 1993. p. 225–7.
80. Anderson JW, Story L, Sieling B, Chen WJ, Petro MS, Story J. Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*. 1984 Dec;40(6):1146–55.
81. Willment JA, Marshall ASJ, Reid DM, Williams DL, Wong SYC, Gordon S, et al. The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1539–47.
82. Sun L, Zhao Y. The biological role of dectin-1 in immune response. *Int Rev Immunol*. 2007;26(5-6):349–64.
83. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med*. 2003 May;197(9):1119–24.
84. Rahar S, Swami G, Nagpal N, Nagpal MA, Singh GS. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(2):94–103.
85. Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(12):869–76.
86. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). *Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos*. 2013.
87. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). *Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA*. CONCEA. 2013.
88. Conselho Federal de Medicina Veterinária. *Guia de Boas Práticas para Eutanásia de Animais: Conceitos e procedimentos recomendados*. 2013.

89. May M. Brazilian drug companies hope to benefit from foreign investment. *Nature medicine*. 2011. p. 1171.
90. Munos B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Dec;8(12):959–68.
91. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007 Mar;70(3):461–77.
92. Li JW-H, Vederas JC. [Drug discovery and natural products: end of era or an endless frontier?]. *Biomed Khim.*; 2011;57(2):148–60.
93. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Mar;4(3):206–20.
94. Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK. A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012 Jan;4(1):27–42.
95. Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1967 Oct;126(1):201–5.
96. Wang C-Y, Liao JK. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*. 2012;821:421–33.
97. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, et al. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*. 2013 May;19(5):557–66.
98. Clegg DJ, Gotoh K, Kemp C, Wortman MD, Benoit SC, Brown LM, et al. Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. *Physiol Behav*. 2011 Apr;103(1):10–6.
99. Air EL, Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology*. 2002 Jun;143(6):2449–52.
100. Ryan KK, Li B, Grayson BE, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ. A role for central nervous system PPAR- γ in the regulation of energy balance. *Nat Med*. 2011 May;17(5):623–6.
101. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, et al. Brain PPAR- γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med*. 2011 May;17(5):618–22.
102. Guerra Dore CMP, Azevedo TCG, de Souza MCR, Rego LA, de Dantas JCM, Silva FRF, et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of beta-glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. *Int Immunopharmacol*. 2007 Sep;7(9):1160–9.
103. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:219–46.
104. Lee M-J, Wu Y, Fried SK. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 Jul;13(4):371–6.
105. Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllof B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPAR γ -selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res*. 1999

- Jul;40(7):1177–84.
106. Garcia-Ruiz I, Rodriguez-Juan C, Diaz-Sanjuan T, Martinez MA, Munoz-Yague T, Solis-Herruzo JA. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology*. 2007 Aug;46(2):414–23.
 107. Rull A, Geeraert B, Aragones G, Beltran-Debon R, Rodriguez-Gallego E, Garcia-Heredia A, et al. Rosiglitazone and fenofibrate exacerbate liver steatosis in a mouse model of obesity and hyperlipidemia. A transcriptomic and metabolomic study. *J Proteome Res*. 2014 Mar;13(3):1731–43.
 108. Choi SS, Diehl AM. Hepatic triglyceride synthesis and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Lipidol*. 2008 Jun;19(3):295–300.

ANEXO I

Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Uso Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.


Universidade de Brasília
 Instituto de Ciências Biológicas
 Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 13 de outubro de 2015.

DECLARAÇÃO (2ª VIA)

Declaramos que o adendo ao projeto intitulado "EFEITOS DO EXTRATO DE RYNCHLYTRUM REPENS EM MODELO MURINO DE **OBESIDADE E DIABETES INDUZIDOS POR DIETA HIPERLIPÍDICA.**", UnBDoC n.º 67153/2014, sob responsabilidade da Professora Angélica Amorim Amato foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília.



 Profa. Dra. Paula Diniz Galera
 Coordenadora da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.