



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CURSO DE MEDICINA

**Extrato rico em polifenóis de folhas de *Syzygium cumini* (L.)  
Skeels promove melhora do perfil glicoinsulínico em  
camundongos pré-diabéticos**

São Luís – MA

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

CURSO DE MEDICINA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Extrato rico em polifenóis de folhas de *Syzygium cumini* (L.)  
Skeels promove melhora do perfil glicoinsulínico em  
camundongos pré-diabéticos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Medicina da Universidade Federal do  
Maranhão para obtenção do grau de bacharel  
em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes

Acadêmico: **João Lucas de Lima Fontelles** – Matrícula: 2011007077

São Luís - MA

2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Nucleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

de Lima Fontelles, Joao Lucas.

Extrato rico em polifenóis de folhas de *Syzygium cumini* L. Skeels promove melhora do perfil glicoinsulínico em camundongos pré-diabéticos / João Lucas de Lima Fontelles. - 2016.

33 f.

Orientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Trabalho de conclusao de curso (Graduação) - Curso de Medicina, Universidade Federal do Maranhao, Sao Lu^s, 2016.

1. Diabetes mellitus. 2. Medicina tradicional. 3. *Syzygium cumini*. I. de Andrade Paes, Antonio Marcus. II. Título.

**JOÃO LUCAS DE LIMA FONTELLES**

**EXTRATO RICO EM POLIFENÓIS DE FOLHAS DE *SYZYGium CUMINI* (L.) SKEELS  
PROMOVE MELHORA DO PERFIL GLICOINSULÍNICO EM CAMUNDONGOS PRÉ-  
DIABÉTICOS**

Monografia apresentada ao Curso de Medicina da  
Universidade Federal do Maranhão como requisito à  
obtenção do grau de médico.

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

Nota: \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr Antonio Marcus de Andrade Paes - Orientador  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Ms Bruno Araújo Serra Pinto – Examinador 1  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Ms. Lilalea Gonçalves França – Examinador 2  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof.<sup>a</sup> Ms. Karla Frida Torres Flister – Examinador 3  
Universidade Federal do Maranhão

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos da mesma árvore e aos da árvore vizinha.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, com o coração na mão, aos meus pais Carlos Edwar e Marilene pelo regozijo da prole e pelo apoio incondicional ao longo destes 25 anos.

Agradeço ao meu irmão Bruno pelos desaconselhados conselhos, à minha cunhada Juliana pelos risos exaltados e ao meu sobrinho Lorenzo pela fofura semanal.

Agradeço à Elza e Marla pelos mimos diários.

Agradeço à minha vida, Márcia Mileni pelas torras de carinho e incentivo.

Agradeço aos meus sogros César e Rose pelo sentimento de pertencimento e confiança.

Agradeço ao Lefisio, em especial ao professor Marcus, por aportar as embarcações dos bravos e por me permitir fazer ciência.

Agradeço aos meus amigos, companheiros de peleja diária e salteadores de cronogramas semanais.

A vida me tem sido muito boa por conta de vocês. Na certeza de que serão eternos, registro aqui meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
<b>Material botânico</b> .....	13
<b>Preparo do extrato rico em polifenóis (ERP)</b> .....	13
<b>Desenho experimental</b> .....	14
<b>Função do eixo glicoinsulínico</b> .....	16
<b>Atividade lipolítica</b> .....	16
<b>Secreção de insulina em células INS-1E</b> .....	17
<b>Análise estatística</b> .....	18
<b>RESULTADOS</b> .....	18
<b>Evolução ponderal de camundongos pré-diabéticos induzidos por DRS e tratados com ERP</b> .....	18
<b>Grupos DRS e ERP não alteram o perfil morfométrico e bioquímico</b> .....	19
<b>Atividade lipolítica não se altera em grupos DRS ou ERP</b> .....	20
<b>Restauração do eixo glicoinsulínico em grupo ERP</b> .....	21
<b>ERP promove secreção de insulina e proliferação celular em linhagem <math>\beta</math> insulinômica INS-1E</b> .....	23
<b>DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	30
<b>DECLARAÇÕES</b> .....	30
<b>CONFLITO DE INTERESSES</b> .....	30
<b>COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

## RESUMO

**Introdução:** No cenário pandêmico de síndrome metabólica provocada, dentre outros fatores, pelo consumo excessivo de sacarose, a busca por fármacos prototipados da fitoterapia com o mínimo ou nenhum efeito colateral tornou-se um desafio. Neste aspecto, os efeitos do extrato rico em polifenóis (ERP) obtido de folhas do *Syzygium cumini* sobre o eixo glicoinsulínico foram analisados em camundongos com pré-diabetes induzida por dieta rica em sacarose (DRS).

**Métodos:** Camundongos Swiss foram alimentados com DRS ao longo de 90 dias, dos 60 aos 150 dias de vida. A partir dos 120 dias de vida, os animais DRS foram tratados com ERP (50 mg/kg/dia, n = 9, Grupo DRS+ERP) ou solução salina (NaCl 0,9%, n = 9, Grupos DRS) por 30 dias. Os testes de tolerância oral à glicose (TTOG) e de tolerância à insulina (TTI) foram realizados ao longo dos últimos 3 dias de tratamento. Aos 150 dias de vida, o Índice de Lee foi determinado, a concentração sérica de triglicérides (TG) foi determinada, fígado, músculos gastrocnêmio e sóleo, tecido adiposo retroperitoneal e periepídidimo foram coletados e pesados. Por meio do tecido adiposo periepídidimo avaliou-se a atividade lipolítica basal e estimulada por isoproterenol. Experimentos *in vitro* de secreção de insulina e viabilidade celular em células pancreáticas da linhagem INS-1E foram realizados. Os resultados foram avaliados pelo one-way ANOVA e comparações múltiplas foram obtidas pelo pós teste de Newman-Keuls.

**Resultados:** O tratamento com ERP na dose de 50 mg/kg/dia por 30 dias em animais pré-diabéticos promoveu melhora da sensibilidade à insulina e tolerância à glicose. O ERP evidenciou sua atividade insulinogoga quando incubado em células INS-1E, assim como elevou a viabilidade celular em concentrações menores ou iguais a 300 µg/mL. A DRS falhou em

promover aumento ponderal ou do Índice de Lee, além de não alterar parâmetros bioquímicos, como glicemia em jejum e alimentado e triglicérides. Não há alteração da atividade lipolítica nos animais induzidos.

**Conclusões:** Os resultados expostos acima permitem concluir que o extrato o ERP de folhas do *Syzygium cumini* é capaz de atuar sobre os estágios mais precoces do diabetes mellitus em camundongos pré-diabéticos induzidos por DRS. O artigo sugere que a miricetina é a principal responsável pelas atividades insulinagoga e sensibilizadoras de insulina encontradas no ERP.

**Palavras-Chave:** síndrome metabólica, resistência à insulina, atividade insulinagoga, frutose, polifenóis, *Syzygium cumini*, jambolão, miricetina, medicina tradicional

## ABSTRACT

**Introduction:** At the pandemic scenario of metabolic syndrome caused, among other factors, by excessive consumption of sucrose, the search of prototyped drugs of herbal medicine with minimal or no side effects has become a challenge. In this concern, the effects of the polyphenols-rich extract (ERP) obtained by *Syzygium cumini* leaves on the glyco-insulin axis were analyzed in mice with pre-diabetes induced by high sucrose diet (DRS).

**Methods:** Swiss mice were fed with DRS over 90 days, from 60 to 150 days of life. From the 120 days, the animals were treated with ERP (50 mg/kg/day, n = 9, DRS + ERP group) or saline (NaCl 0.9%, n = 9, DRS group) for 30 days. The oral glucose tolerance test (OGTT) and the insulin tolerance test (TTI) were performed over the last 3 treatment days. After 150 days of life, Lee's index was determined, the triglyceride (TG) was measured, liver, gastrocnemius and soleus muscles, retroperitoneal and periepididymal adipose tissue were collected and weighed. By the periepididymal adipose tissue we evaluate the basal lipolytic activity and stimulated by isoproterenol. Experiments *in vitro* of insulin secretion and cell viability in INS-1E pancreatic cells were performed. The results were evaluated by one-way ANOVA and multiple comparisons were obtained by Newman-Keuls post test.

**Results:** The treatment with ERP at a dose of 50 mg/kg/day for 30 days in pre-diabetic animals promotes an improvement in insulin sensitivity and glucose tolerance. The ERP showed insulinogogue activity when incubated in INS-1E cells, as well as increased cell viability at concentrations less than or equal to 300 µg/mL. DRS failed to promote weight gain or a higher Lee index, and does not alter biochemical parameters such as fasting and fed glycemia, as so as the triglicerydes. No changes in basal or induced lipolytic activity was observed.

**Conclusions:** The presented results allow us to conclude that the ERP is able to act on the early stages of diabetes mellitus in pre-diabetic mice induced by DRS. The article suggests that myricetin is the main responsible for insulinogogue and sensitizing activities of insulin found in ERP.

**Keywords:** metabolic syndrome, insulin resistance, insulinogogue activity, fructose, polyphenols, *Syzygium cumini*, jambolan, myricetin, traditional medicine

## INTRODUÇÃO

Mundialmente, estima-se que 422 milhões de adultos possuam diabetes mellitus tipo 2 (DM2) de acordo com o último relatório da Organização Mundial de Saúde [1], observando-se o aumento da prevalência global de 4,7% para 8,5% na população adulta nos últimos 30 anos [1]. Nos Estados Unidos a prevalência de DM2 em adultos é de 29 milhões e 86 milhões são pré-diabéticos [2]. Em outros termos, aproximadamente 40% dos adultos norte americanos possuem algum grau de resistência à insulina [3]. DM2 é uma doença metabólica caracterizado por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção ou ação da insulina, ou em ambas [4]. Diversas causas, incluindo os componentes dietéticos, correlacionam-se com a gênese desta situação, tendo a frutose importante papel no desdobramento deste cenário [5]. A sacarose é um dissacarídeo constituído de um monômero de glicose e outro de frutose conectados por uma ligação glicosídica. A frutose, por ser o carboidrato naturalmente mais doce [6] e devido ao seu baixo custo [7], hoje constitui mais de 40% do consumo de adoçantes no mundo [7] e se tornou o principal responsável pelo total de carboidratos ingeridos mundialmente [8]. Apesar de apresentarem ligeira diferença estrutural, há vasta diferença metabólica entre a glicose e a frutose; de forma que esta última ignora as etapas limitantes da glicólise para, assim, elevar a fosforilação oxidativa, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a subsequente lipogênese *de novo* [9]. Sobre esta luz, o elevado consumo de frutose tem sido associado ao desenvolvimento da DM2, pré-diabetes e obesidade como uma das muitas causas possíveis.

Ainda que se saiba do elevado valor das alterações dietéticas e a prática de exercícios físicos para a melhora do paciente com DM2, a adesão a esta etapa do tratamento é baixa. Neste cenário surgiram diversas drogas voltadas para a a melhora da qualidade e sobrevida deste

paciente, que apesar de muito eficientes, apresentam elevada prevalência de efeitos adversos e, por conta disso, baixa adesão [10]. Abordagens medicinais alternativas e complementares, tais como o uso de fitoterápicos, tem sido utilizadas pela população há séculos. Ainda, representam importante campo de pesquisa da indústria farmacêutica, considerando-se o uso dos compostos bioativos extraídos destas plantas, tais quais os flavonóides e outros compostos polifenólicos, como protótipos para o desenvolvimento de novas drogas [11],

*Syzygium cumini* (L.) Skeels é uma planta frutífera pertencente à família Myrtaceae, popularmente conhecida como jambolão, jamelão e azeitona-preta [12]. Nativa da Índia, é vastamente utilizada no tratamento de doenças dentro do espectro da medicina tradicional [12]. Diversas propriedades farmacológicas são atribuídas a esta planta, dentre elas as atividades antibacteriana [13], antiinflamatória [14], anti-hiperlipidêmica [15], antioxidante [16, 17], antihiperlicemiante [18] e reparadoras da resistência à insulina [16].

A atividade anti-hiperlicemiante do extrato de sementes do *Syzygium cumini* é bem estabelecida por estudos experimentais e clínicos [18-21]. Os flavonóides presentes neste extrato possuem atividade insulinagoga e efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes [19]. Em trabalho anterior, nosso grupo sugeriu que os polifenóis presentes no extrato etanólico de folhas do *Syzygium cumini* seriam os responsáveis pela atividade reguladora da homeostasia glicolinsulínica em modelo de síndrome metabólica [22].

A ação do *Syzygium cumini* sobre as propriedades metabólicas são bem descritas em modelos diabéticos agressivos [23-25]. No entanto, há poucos dados acerca de sua ação nos estágios mais precoces do DM2. Para tanto, a utilização de animais resistentes ao desenvolvimento de outras características da síndrome metabólica, como a dislipidemia e

doenças cardiovasculares, fazem do camundongos Swiss [26], uma excelente oportunidade de avaliarmos os efeitos do extrato rico em polifenóis (ERP) nas folhas de *Syzygium cumini* em um modelo pré-diabético

Apesar da informação acerca dos efeitos protetores do *Syzygium cumini* sobre a homeostasia glicoinsulínica, não há estudos que demonstrem o impacto na progressão do diabetes mellitus. Nosso objetivo é avaliar a influência do extrato rico em polifenóis de folhas do *Syzygium cumini* em um modelo pré-diabético induzido por dieta rica em sacarose.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material botânico**

No mês de outubro de 2015, folhas da espécie vegetal *Syzygium cumini* (L.) Skeels foram coletadas no Campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão (2°33'11.7"S 44°18'22.7"W). Espécimes da folha foram identificadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Maranhão sob o número #4573.

### **Preparo do extrato rico em polifenóis (ERP)**

O preparo do ERP baseou-se em processo descrito anteriormente [27] com algumas modificações. Brevemente, folhas de *Syzygium cumini* foram secas a 38°C em estufa com fluxo de ar, para então serem pulverizadas e posteriormente submetidas à maceração sob agitação constante por 24h a 25°C em solução etanol:água (70:30, v/v). O produto da maceração foi filtrado com papel filtro e o material residual foi submetido novamente ao ciclo maceração-filtração nas condições anteriores, realizando-se este processo num total de três vezes. Os

extratos resultantes deste processo foram reunidos e submetidos à centrifugação à 3500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi concentrado em rotaevaporação à 38°C e posteriormente submetido à partição clorofórmio (1:1, v/v) três vezes. A fase aquosa resultante foi lavada com acetato de etila (1:1, v/v) em mais três repetições. A fração acetato de etila foi concentrada em rotaevaporação também à 38°C e liofilizada, finalizando o processo de obtenção do ERP. Este ERP resultante foi guardado a 4°C e ao abrigo da luz até o uso, sendo o pó diluído em água destilada.

### **Desenho experimental**

Camundongos machos da espécie *Mus musculus* com 30 dias de vida, cedidos pelo biotério da Universidade Federal do Maranhão, foram alojados em sala com controle de temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro-escuro (07:00-19:00) e acesso livre a água e ração padrão para roedores (Nuvital<sup>®</sup>, Nuvilab CR-1, Brasil). Aos 60 dias de vida os animais foram separados aleatoriamente em três grupos, dois deles com dieta rica em sacarose e outro com dieta padrão para roedores até o dia do sacrifício. A dieta rica em sacarose foi manufaturada de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93-M) [28], baseada [29] e de composição descrita anteriormente [30] (Tabela 1). Aos 120 dias de vida iniciou-se o período de tratamento por gavagem com ERP ou soro fisiológico 0,9% por 30 dias consecutivos, dividindo-se os grupos da seguinte forma:

**CTR**, ração padrão para roedores e 5,0 mL/kg/dia de soro fisiológico à 0.9% (n=9);

**DRS**, ração rica em sacarose e 5,0 mL/kg/dia de solução fisiológica à 0.9% (n=9)

**DRS + ERP**, ração rica em sacarose e 50,0 mg/kg/dia de extrato rico em polifenóis (n=9)

Durante todo o período de indução os animais foram pesados a cada duas semanas e à cada uma semana durante o tratamento. Nos dias 27 e 28 do tratamento, os animais foram submetidos ao teste de teste de tolerância à glicose (TTOG) e teste de tolerância à insulina (TTI), respectivamente. No dia 31 do tratamento, após jejum noturno, os animais foram anestesiados (100 mg/kg cetamina, 20 mg/kg xilazina), pesados e mensurados para determinação do Índice de Lee  $[(g^{1/3}/cm) \times 1000]$  [31] e finalmente guilhotinados para coleta de amostras de sangue. Fígado, músculos gastrocnêmio e sóleo, gordura retroperitoneal e periepididimal foram coletados para avaliação morfométrica e análises posteriores. Para a análise sérica, amostras de sangue foram colhidas em tubos de 1,5 mL após decapitação. O soro foi obtido por centrifugação (2000 rpm, 10 min, 22°C) e analisados ainda frescos. Os níveis de triglicerídeos (TG) foram mensurados por kit laboratorial (Labtest, Brasil) com analisador semiautomático por método colorimétrico.

**Tabela 1 | Valores nutricionais de ração padrão e ração isocalórica rica em sacarose**

	Ração padrão	Ração rica em sacarose*
Carboidratos (g)	55,4%	65,0%
Sacarose (g)	10,0%	25,0%
Proteínas (g)	21,0%	12,3%
Lipídeos (g)	5,2%	4,3%
Calorias (Kcal/100 g)	352,	348,0

\*Manufaturada com ração padrão pulverizada (40,0%), leite condensado (40,0%), açúcar refinado (8,5%) e água filtrada *qsp*. Adaptada de Pinto et al, 2016

### **Função do eixo glicoinsulínico**

Para o TTOG os animais foram submetidos a jejum noturno de 8h, seguido de administração via oral de glicose (2 g/kg) como descrito previamente [22]. Para a coleta do sangue capilar, realizou-se o picote da cauda dos camundongos nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 min após administração da glicose. As amostras foram avaliadas de imediato por meio de glicosímetro (Accu-chek Active®, Roche Diagnóstica, Alemanha). Os dados foram expressos como delta da glicemia nos tempos supracitados e como média da área sob a curva (AUC) no período do teste. Método semelhante foi realizado para o TTI intraperitoneal, em que animais alimentados foram submetidos à injeção intraperitoneal de 1 UI/kg de insulina (Humulin R 70/30®. Lilly, EUA). Os dados foram expressos como delta da glicemia nos tempos 0, 10, 15, 30, 45 e 60 min, e como média da AUC.

### **Atividade lipolítica**

Amostras de tecido adiposo periepididimal (~100 mg) foram fragmentadas e incubadas em tampão de Krebs (120 mM NaCl; 15 mM NaHCO<sub>3</sub>; 4.83 mM KCl; 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1.21 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>; 1% BSA e 0.1% glicose após ajuste do pH para 7.4) sob aeração por 1 h à 37°C, segundo protocolo descrito anteriormente [32]. Para a avaliação da atividade lipolítica, as amostras foram incubadas na presença ou não de 20 µM isoproterenol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). As reações foram cessadas em banho gelado e a concentração de glicerol no sobrenadante foi medida por espectrofotometria associada a kit laboratorial para triglicerídeos (Labtest, Brasil), conforme indicação do fabricante.

## Secreção de insulina em células INS-1E

O cultivo das células INS-1E e teste de secreção de insulina estimulada por glicose seguiu metodologia descrita previamente [22], com algumas modificações. Brevemente, o efeito do ERP, diluído logo antes do uso e filtrado por filtros de 0,22 µm, foi estudado na secreção de insulina de células INS-1E. Para tanto,  $2 \times 10^5$  células/poço foram adicionadas a placas de 96 poços durante 24h. Em seguida, ERP nas concentrações de 100 ou 1000 µg/mL foi adicionado ao meio de cultura para incubação de 4 h. O meio de cultura foi então lavado duas vezes com tampão fosfato (PBS) e substituído por tampão Krebs-Ringer Bicarbonato HEPES (KRBH = 135 mM NaCl, 3,6 mM KCl, 5mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 0,1% BSA, pH 7,4) sem glicose por 1 h. Em seguida, adicionou-se 2,8 mM de glicose por 30 minutos, antes da incubação com KRBH contendo 3,3 ou 16,7 mM de glicose por 2h nas mesmas condições atmosféricas. Por fim, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para mensuração posterior dos níveis de insulina por kit de ELISA ultrasensível de acordo com as especificações do fabricante (CrystalChemInc, USA). Para o teste de proliferação celular mensurado pela incorporação do bromodesoxiuridina (BrdU) durante a síntese de DNA,  $2 \times 10^5$  células/poço foram adicionadas a placas de 96 poços durante 24h. Logo, ERP nas concentrações 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL foi adicionado e incubado por 48h em meio de cultura e condições atmosféricas descritas acima. Em seguida, seguiu-se o protocolo segundo descrito pelo fabricante (Roche Diagnóstica, Alemanha).

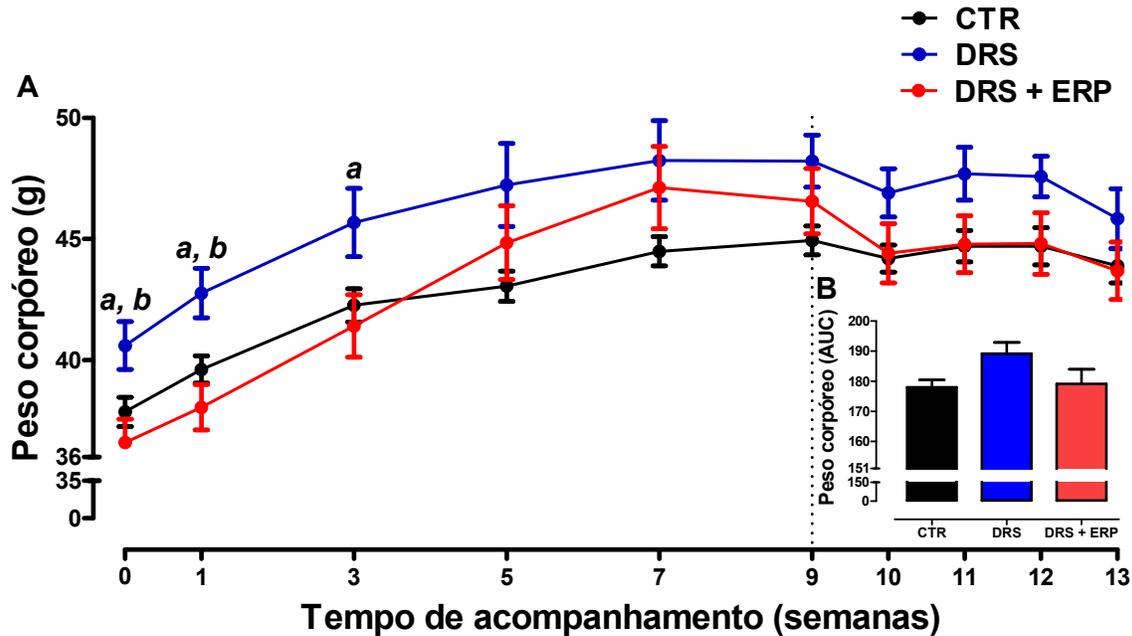
## **Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6-9 por grupo). Comparações intra- e intergrupos foram realizadas por one-way ANOVA. Comparações múltiplas foram obtidas pelo pós teste Newman-Keuls para  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Evolução ponderal de camundongos pré-diabéticos induzidos por DRS e tratados com ERP**

O peso corpóreo do grupo DRS+ERP mostrou-se diminuído quando comparado ao grupo DRS tanto na primeira [(DRS)  $39.95 \pm 0.85$  g vs (DRS + ERP)  $36.60 \pm 0.97$  g,  $p=0.026$ , Fig.1] quanto na segunda semana de dieta [(DRS)  $42.05 \pm 0.83$  g vs  $38.06 \pm 0.94$  g (DRS + ERP),  $p=0.006$ , Fig.1]. Houve diferença também entre os grupos CTR e DRS na segunda semana de dieta [(CTR)  $39.73 \pm 0.51$  g vs (DRS)  $42.05 \pm 0.83$  g,  $p=0.025$ , Fig. 1]. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos quanto ao peso nas outras semanas do estudo, tanto pré-, quanto pós tratamento, o que pode ser explicado pela característica isocalórica da DRS (Tabela 1).



**Fig. 1 | Efeito do tratamento com extrato rico em polifenóis (ERP) de folhas do *Syzygium cumini* no ganho ponderal.** Grupo de camundongos machos com 60 dias de vida foram alimentados com dieta rica em sacarose (DRS) ao longo das 13 semanas do estudo. No final da 9 semana iniciou-se o tratamento com ERP (50 mg/kg/dia, v.o.) por 4 semanas. Dados são média  $\pm$  EPM ( $n = 8-9$  por grupo) comparado pelo one-way ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. Letras denotam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação a <sup>a</sup>DRS + ERP ou <sup>b</sup>CTR.

### Grupos DRS e ERP não alteram o perfil morfométrico e bioquímico

Corroborando com os dados ponderais expostos anteriormente, a DRS não promoveu aumento do Índice de Lee, do peso do fígado ou gorduras retroperitoneais e periepididimais (Tabela 2). No entanto, o grupo tratado com ERP apresentou menor peso muscular esquelético quando comparado ao grupo DRS ( $3,39 \pm 0,17$  vs  $4,99 \pm 0,60$  g/100 g peso,  $p=0,02$ ). Em relação aos parâmetros bioquímicos, não há aumento das glicemias em jejum e alimentado, evidenciando um estado não diabético do animal induzido com DRS. Além disso, a DRS não promoveu aumento dos níveis de triglicerídeos dos camundongos no final dos 90 dias de dieta.

**Tabela 2 | Efeito do ERP sobre dados morfométricos e bioquímicos de animais alimentados com DRS**

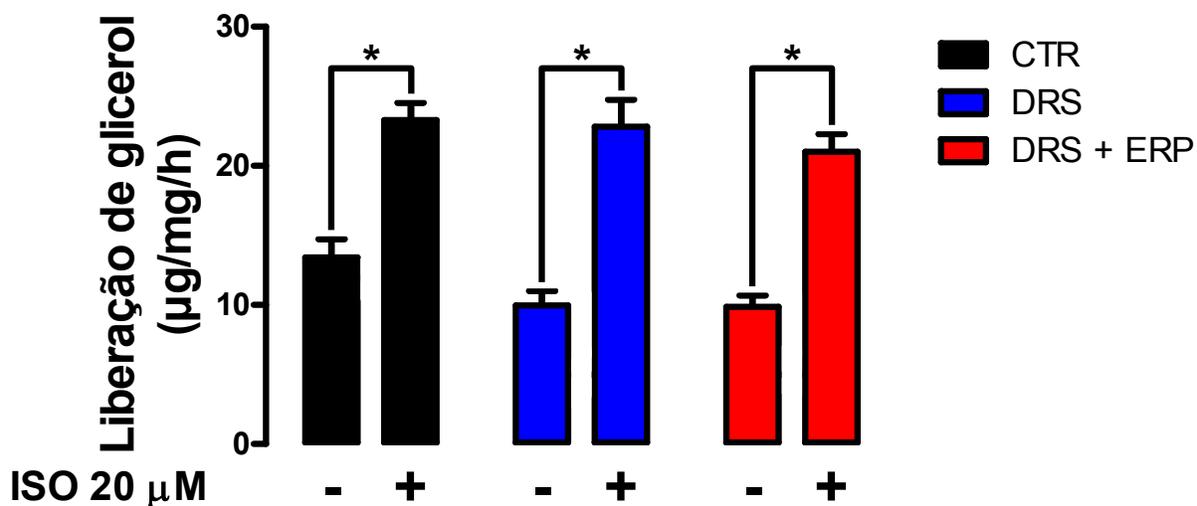
	<b>CTR</b>	<b>DRS</b>	<b>DRS + ERP</b>
<b>Parâmetros morfométricos (g/100 g peso)</b>			
Peso final (g)	44,04 ± 0,64	45,84 ± 1,23	43,69 ± 1,18
Comprimento nasoanal (cm)	10,16 ± 0,14	10,26 ± 0,14	10,30 ± 0,21
Índice deLee [(g <sup>1/3</sup> /cm) x 1000]	348,20 ± 4,90	350,90 ± 3,67	342,60 ± 6,13
Gordura retroperitoneal	0,65 ± 0,16	0,58 ± 0,12	0,86 ± 0,17
Gordura periepididimal	1,47 ± 0,22	1,97 ± 0,45	2,70 ± 0,52
Fígado	5,03 ± 0,05	5,37 ± 0,36	4,99 ± 0,27
Músculo esquelético	3,96 ± 0,11	4,99 ± 0,60	3,39 ± 0,17 <sup>a</sup>
<b>Parâmetros bioquímicos (mg/dL)</b>			
Glicemia em jejum	120,56 ± 3,10	123,40 ± 8,63	151,11 ± 14,04
Glicemia alimentado	154,89 ± 7,51	137,75 ± 7,20	153,87 ± 5,12
Triglicerídeos	74,02 ± 10,73	68,72 ± 6,65	76,02 ± 9,64

Dados são média ± EPM comparado por one-way ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. <sup>a</sup>denota diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo DRS,  $n = 7-9$ . Os tecidos foram coletados mediante eutanásia após 12-h de jejum

### **Atividade lipolítica não se altera em grupos DRS ou ERP**

Afim de caracterizar os efeitos da DRS e do tratamento com ERP na adiposidade, investigamos a atividade lipolítica basal e estimulada com isoproterenol de tecido adiposo periepididimal de todos os grupos (Fig. 2). Tanto a DRS, quanto o tratamento com ERP não provocaram alterações na atividade lipolítica em condições basais [(CTR) 13,41 ± 1,33 , (DRS)

9,97 ± 1,04, (DRS + ERP) 8,92 ± 0,84,  $p > 0,05$ ,  $n = 8-9$ ] ou estimulada [(CTR) 23,29 ± 1,24, (DRS) 22,82 ± 1,95, (DRS + ERP) 21,01 ± 1,29,  $p > 0,05$ ,  $n = 8-9$ ].

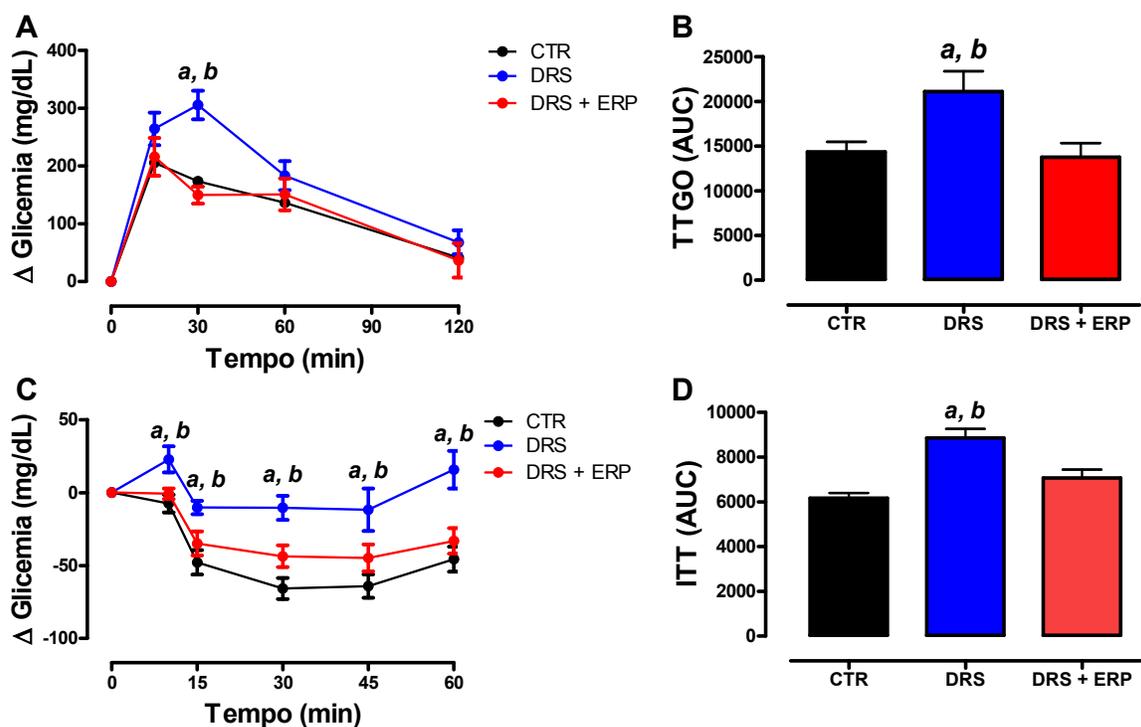


**Fig.2 | Efeito do extrato rico em polifenóis (ERP) de folhas do *S. Cumini* na atividade lipolítica de tecido adiposo periepididimal.** Atividade lipolítica basal e estimulada por isoproterenol foi avaliada em amostras de tecido adiposo coletadas de camundongos de 150 dias de vida e alimentados com dieta rica em sacarose (DRS) ou ração padrão e tratados ou não com ERP (50 mg/kg/dia, v.o.) por 4 semanas. Os resultados são expressos como média ± EPM ( $n = 8-9$  por grupo) comparado pelo one-way ANOVA e pós-teste Newman Keuls. \* denota diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre basal (-) e isoproterenol (ISO 20 μM) induzido.

### Restauração do eixo glicoinsulínico em grupo ERP

No intuito de investigar os efeitos da exposição precoce à DRS no eixo glicoinsulínico, os grupos foram submetidos ao TTGO e TTI (Fig. 3). Os grupos não apresentaram diferença nas glicemias basais, tanto em jejum, quanto alimentado (Tabela 2). Após administração em bolus de glicose, apenas o grupo DRS não atingiu a glicemia máxima

nos primeiros 15 min, tendo o feito em 30 min, evidenciando maior dificuldade de captação de glicose e retorno aos níveis basais de glicemia. Todos os grupos voltaram à glicemia próxima da basal em 2 h. O cálculo da AUC-TTGO mostrou que os camundongos DRS tinham maior tolerância à glicose ( $21122 \pm 2278$ , n=5) quando comparados ao grupo CTR ( $14359 \pm 1148$ , n=9, p=0.01). Além disso, a sensibilidade periférica à insulina também estava comprometida no animal DRS ( $8855 \pm 406.8$ , n=8) se comparado ao CTR ( $6176 \pm 228.9$ , n=9). O tratamento com ERP melhorou tanto a tolerância à glicose [(DRS)  $21122 \pm 2278$  vs (DRS + ERP)  $13753 \pm 1599$ , p=0.02, n=5-7], quanto a sensibilidade à insulina [(DRS)  $8855 \pm 406.8$  vs (DRS + ERP)  $7072 \pm 372.7$ , n=8, p=0.006]. Tomados em conjunto, os dados até aqui apresentados evidenciam modelo de pré-diabetes induzido por DRS e melhora do eixo glicoinsulínico pelo tratamento com ERP.

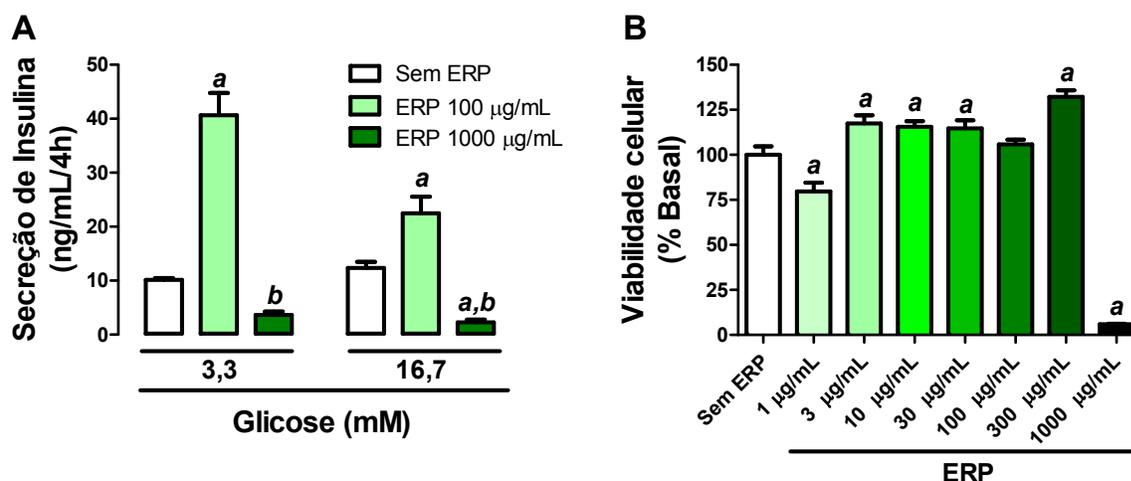


**Fig.3 | Efeito do extrato rico em polifenóis (ERP) de folhas do *S. Cumini* na funcionalidade do eixo glicoinsulínico.** Testes de tolerância oral à glicose (TTGO) e intraperitoneal à insulina (ITT) foram realizados para avaliar a função do eixo glicoinsulínico em camundongos alimentados com dieta rica em sacarose (DRS) ou ração padrão (CTR) e tratados ou não com ERP (50 mg/kg/dia, v.o.) na 13ª semana do estudo. A glicemia foi mensurada em amostras de sangue capilar coletadas pelo método de corte caudal em extremidade. (A) Alterações glicêmicas durante TTGO; (B) Acúmulo total do  $\Delta$  glicêmico reportado como AUC no TTGO. (C) Alterações glicêmicas durante ITT; (D) Acúmulo total do  $\Delta$  glicêmico reportado como AUC no ITT. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 8-9$  por grupo) comparado pelo one-way ANOVA e pós-teste Newman Keuls. Letras denotam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação a <sup>a</sup>CTR ou <sup>b</sup>DRS + ERP.

### ERP promove secreção de insulina e proliferação celular em linhagem $\beta$ insulinômica INS-1E

No intuito de avaliar se o ERP promoveria alguma atividade insulinagoga, incubamos o ERP em cultura de células derivadas de insulinoma INS-1E, cujo modelo é bem caracterizado para o estudo da função  $\beta$  pancreática [33]. O ERP foi incubado em células INS-1E

nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL, apresentando secreção de insulina aproximadamente três vezes superior ao basal [(100 µg/mL)  $40,626 \pm 9,066$  vs (Sem ERP)  $2,952 \pm 0,6791$ ,  $p < 0,001$ ,  $n=6-8$ ] em condições normoglicêmicas (3,3 mM) e igual ao dobro [(100 µg/mL)  $22,49 \pm 3,086$  vs (Sem ERP)  $2,273 \pm 0,4822$ ,  $p < 0,01$ ,  $n=8$ ] em condições hiperglicêmicas (16,7 mM). Devido à diminuição da secreção de insulina na concentração de 1000 µg/mL de ERP, cogitamos a possibilidade de um efeito citotóxico do extrato nesta concentração. Para tanto, realizamos o ensaio de incorporação do BrdU para estimativa da viabilidade celular em cultura de células INS-1E incubadas com ERP nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000 µg/mL por 48 horas. O ERP promoveu aumento significativo da viabilidade celular nas concentrações entre 3 e 300 µg/mL [(3 µg/mL)  $117,394 \pm 4,529$ , (10 µg/mL)  $115,581 \pm 3,093$ , (30 µg/mL)  $114,657 \pm 4,517$ , (300 µg/mL)  $132,219 \pm 3,639$ , % em relação ao (Sem ERP),  $p < 0,05$ ,  $n=7-9$ ], com exceção à concentração de 100 µg/mL [(100 µg/mL)  $105,871 \pm 2,518$ , em relação ao (Sem ERP),  $p=0,78$ ]. Na concentração de 1000 µg/mL, o ERP promoveu redução de 94,2% da viabilidade celular na concentração se comparado ao basal [(1000 µg/mL)  $5,893 \pm 0,2364$ , em relação ao (Sem ERP),  $p < 0,0001$ ]. O maior incremento na viabilidade celular ocorreu na concentração de 300 µg/mL de ERP.



**Fig.4 | Efeito do extrato rico em polifenóis (ERP) de folhas do *S. Cumini* na secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS) *in vitro* e na viabilidade celular.** (A) Secreção de insulina em condição basal (3,3 mM de glicose) ou estimulada (16,7 mM de glicose – GSIS) em células  $\beta$  insulinômicas INS-1E ( $2 \times 10^5$  células/poço) incubadas com 100 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de ERP por 4-h a  $37^\circ\text{C}$ . (B) Incorporação do BrdU durante síntese de DNA ao final de 48 h de incubação com o ERP nas concentrações de 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 8$  por grupo). Letras denotam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação à condição <sup>a</sup>basal (*i.e.* sem ERP), <sup>b</sup>100  $\mu\text{g/mL}$  de ERP. Dados foram analisados por one-way ANOVA seguido de pós-teste Newman Keuls.

## DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição a DRS leva a um estado pré-diabético e que o ERP promove melhora do eixo glicoinsulínico mesmo neste estágio mais precoce do DM2. Primeiramente, os camundongos pré-diabéticos não apresentaram alterações ponderais ou adipocitárias, mas ainda assim obtiveram melhora da resistência à insulina e sensibilidade à glicose quando tratados com o ERP. Além disso, o ERP possui atividade insulinagoga demonstrada *in vitro*. Juntos, estes resultados sugerem que o ERP age precocemente sobre a égide do DM2 por mais de uma via, sustentando seu lugar na medicina tradicional e validando seu uso como protótipo para novas drogas no tratamento e prevenção do DM2 .

Neste estudo, evidenciou-se que os efeitos da exposição à DRS em camundongos Swiss não promoveu aumento de peso corpóreo, uma vez que se trata de uma dieta isocalórica e com menor quantidade de sacarose se comparada a outras DRS já estudadas [34]. Resultado semelhante já foi relatado na literatura [34, 35], e ainda, que a adição de gordura ou a substituição de parte do carboidrato por gordura, tornando a dieta hipercalórica, promove aumento de peso corpóreo significativo em menor tempo de exposição [36]. A possibilidade de que os animais fossem obesos e ainda assim não diferissem quanto aos seus pesos foi descartada pelo Índice de Lee - fórmula utilizada para estimar a massa corporal em roedores [31]. O tratamento com ERP no tempo proposto não interferiu na evolução ponderal dos animais, provavelmente pelo fato de não se tratar de animais obesos [37].

Como já demonstrado em outros estudos, a DRS isoladamente não promove incremento da adiposidade intra-abdominal [34], contribuindo para o estabelecimento do perfil não-obeso e normolipêmico em camundongos Swiss. Já os camundongos da linhagem C57BL/6, quando expostos à mesma dieta, apresentaram-se dislipidêmicos [38]. Ainda que o ERP não tenha alterado a deposição de gordura ou mesmo os níveis de TG, já foi descrito na literatura que o extrato fenólico de sementes do *Syzygium cumini* promove melhora da homeostasia adipocitária em outros modelos [24]. Logo, não se pode concluir que o ERP seja incapaz de promover diminuição da lipogênese, dado que os animais não são obesos ou hipertrigliceridêmicos. Por outro lado, os dados presentes neste trabalho, em conjunto com os já descritos previamente nos permitem inferir que o ERP das folhas do *Syzygium cumini* possui efeito anti-hiperlipemiante, e não hipolipemiante.

Neste estudo, camundongos DRS apresentaram resistência à insulina e intolerância à glicose nos testes de TTI e TTGO, respectivamente, ainda que tenham evidenciado glicemias em jejum e alimentado normais, sugerindo um modelo pré-diabético. A resistência à insulina permanece até os dias de hoje um fenômeno de estresse celular pouco entendido, associado a doenças crônicas e ao envelhecimento [39-41]. Contudo, uma teoria surgiu nos últimos anos sugerindo que o excesso de radicais livres poderiam alterar a transdução de sinais celulares, transcrição proteica e o processamento pós-transcricional [42-44]. Nesse ínterim, a frutose passa a ter importante papel na égide da elevação do estresse oxidativo e consequente aparecimento da resistência à insulina [45-47]. A glicose possui a capacidade de reagir com o grupo amino das proteínas por meio da reação de Maillard, formando os produtos de glicação proteica. Quando a frutose é o substrato, a reação passa a se chamar frutossilacção [48]. Diferentemente da glicose, em pH fisiológico, a frutose se apresenta extensamente na forma linear. Devido a isto, ela é sete vezes mais reativa que a glicose na formação endógena de produtos finais de glicação avançada [48-50] e pode gerar até cem vezes mais EROs que a glicose [51, 52]. Portanto, a frutose exerce papel mais substancial do que a glicose na resistência à insulina derivada da geração de EROs.

Ainda que o ERP não tenha promovido diminuição dos níveis glicêmicos em jejum e alimentado, o mesmo promoveu melhora da resistência à insulina e da tolerância à glicose. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* nos últimos 20 anos investigaram os efeitos antidiabetogênicos dos compostos polifenólicos [53, 54]. Devido a isso, inúmeros mecanismos foram descobertos como restauradores do eixo glico-insulínico, tais como a inibição da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase, a inibição da absorção intestinal de glicose, proteção de células  $\beta$ -

pancreáticas, inibição dos produtos avançados de glicação, atividade insulinagoga, ativação do sistema sinalizador das PPARs e de genes envolvidos na gliconeogênese e glicogênese [55-57].

Dos mecanismos supracitados, um composto fenólico cujos derivados foram identificados no ERP (dados não publicados), a miricetina, reverteu o defeito na expressão de IRS-1 e na subunidade regulatória p85 da PI3K em ratos alimentados com dieta rica em frutose [58]. Além disso, o mesmo estudo apresentou melhora na ação da insulina sobre a translocação dos receptores GLUT4 do meio intracelular para a membrana plasmática. Em trabalho anterior [22] nosso grupo sugeriu que o extrato etanólico de folhas do *Syzygium cumini* tem a propriedade de melhorar a tolerância à glicose devido ao aumento da sensibilidade à insulina, de forma que a resposta glicêmica ocorre apenas em condições de hiperglicemia [12]. Portanto, a insuficiência do ERP em promover diminuição dos níveis glicêmicos de nossos animais não deve ser visto como uma limitação, dado que são normoglicêmicos.

No intuito de avaliar a viabilidade de outras justificativas para a melhora do eixo glicoinsulínico, realizamos o experimento da atividade insulinagoga do ERP em células INS-1E [22], um modelo bem caracterizado de estudo da função  $\beta$  pancreática [33]. O ERP 100  $\mu\text{g/mL}$  apresentou elevada capacidade insulinagoga, ainda que comparada a resultado previamente descrito com o uso de extrato etanólico de folhas do *Syzygium cumini* (dados não publicados), tal qual apresentou o dobro da capacidade secretora de insulina sobre células INS-1E em condições normoglicêmicas [22]. Corroborando nossos dados, alguns estudos já elencaram os flavonóides como promotores da secreção de insulina por meio da ativação direta dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L [59, 60]. Disso, evidencia-se o potencial secretor de insulina dos polifenóis presentes no ERP e sugere-se que o mecanismo de ação seja o mesmo supracitado. Já em condições hiperglicêmicas,

a secreção de insulina promovida pelo ERP foi menor quando comparada às condições normoglicêmicas. Tal fato se deve, provavelmente, aos efeitos citotóxicos da hiperglicemia experimental associada à elevada concentração de açúcares presentes no ERP [dados não publicados].

Outro ponto a ser avaliado é a reduzida secreção de insulina quando incubados com ERP 1000 µg/mL em ambas as condições. Este resultado edificou a hipótese de citotoxicidade própria do ERP, confirmada pelo experimento de viabilidade celular, onde há diminuição abrupta da incorporação do BrdU apenas quando a incubação ocorre com o ERP 1000 µg/mL.

## **CONCLUSÃO**

Todos estes efeitos benéficos do ERP sobre os estágios mais primários do DM2 resguardam o uso do *Syzygium cumini* pela medicina tradicional. Ainda, considerando publicações anteriores de nosso grupo a respeito da atividade das folhas do *Syzygium cumini* sobre determinadas características da síndrome metabólica, mantemos a especulação de que o ERP de folhas de *Syzygium cumini* possui mecanismo de ação duplo e sinérgico, por meio da sensibilização periférica à insulina e efeito modulador/estimulador da função  $\beta$  pancreática. Desta vez, nos aprofundamos no nível molecular, sugerindo a miricetina como composto bioativo responsável pelos efeitos supracitados.

## **LISTA DE ABREVIACÕES**

BrdU – Bromodesoxiuridina

DRS – Dieta rica em sacarose

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ERP – Extrato rico em polifenóis

IRS1 - Substrato 1 do receptor de insulina

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PPAR – Receptores ativados por proliferador de peroxissoma

TG – Triglicerídeos

TTI – Teste de tolerância à insulina

TTOG – Teste de tolerância oral à glicose

## **DECLARAÇÕES**

### **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram não haver interesse algum, além da publicação deste artigo

### **COMITÊ DE ÉTICA**

Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão, sob número 23115.01983/2013-41.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization: **Global report on diabetes**. In.; 2014: 86.
2. Center for Disease Control and Prevention: **National Diabetes Statistics Report: Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States, 2014**. In.; 2014.
3. Gregg EW, Zhuo X, Cheng YJ, Albright AL, Narayan KM, Thompson TJ: **Trends in lifetime risk and years of life lost due to diabetes in the USA, 1985-2011: a modelling study**. *The lancet Diabetes & endocrinology* 2014, **2**(11):867-874.
4. Kharroubi AT, Darwish HM: **Diabetes mellitus: The epidemic of the century**. *World journal of diabetes* 2015, **6**(6):850-867.
5. DiNicolantonio JJ, O'Keefe JH, Lucan SC: **Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences**. *Mayo Clinic proceedings* 2015, **90**(3):372-381.
6. Bantle JP: **Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes**. *The Journal of nutrition* 2009, **139**(6):1263s-1268s.
7. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM: **Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity**. *The American journal of clinical nutrition* 2004, **79**(4):537-543.
8. Gibson S, Gunn P, Wittekind A, Cottrell R: **The effects of sucrose on metabolic health: a systematic review of human intervention studies in healthy adults**. *Critical reviews in food science and nutrition* 2013, **53**(6):591-614.
9. Moore JB, Gunn PJ, Fielding BA: **The role of dietary sugars and de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease**. *Nutrients* 2014, **6**(12):5679-5703.
10. Berthold HK, Gouni-Berthold I: **Hyperlipoproteinemia(a): clinical significance and treatment options**. *Atherosclerosis Supplements* 2013, **14**(1):1-5.
11. Rishton GM: **Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues**. *The American journal of cardiology* 2008, **101**(10a):43d-49d.
12. Ayyanar M, Subash-Babu P: **Syzygium cumini (L.) Skeels: a review of its phytochemical constituents and traditional uses**. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2012, **2**(3):240-246.
13. Binita K, Kumar S, Sharma VK, Sharma V, Yadav S: **Proteomic identification of Syzygium cumini seed extracts by MALDI-TOF/MS**. *Applied biochemistry and biotechnology* 2014, **172**(4):2091-2105.
14. Muruganandan S, Srinivasan K, Chandra S, Tandan SK, Lal J, Raviprakash V: **Anti-inflammatory activity of Syzygium cumini bark**. *Fitoterapia* 2001, **72**(4):369-375.
15. Ravi K, Rajasekaran S, Subramanian S: **Antihyperlipidemic effect of Eugenia jambolana seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats**. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2005, **43**(9):1433-1439.
16. Sharma AK, Bharti S, Kumar R, Krishnamurthy B, Bhatia J, Kumari S, Arya DS: **Syzygium cumini ameliorates insulin resistance and beta-cell dysfunction via modulation of PPAR, dyslipidemia, oxidative stress, and TNF-alpha in type 2 diabetic rats**. *Journal of pharmacological sciences* 2012, **119**(3):205-213.
17. Ruan ZP, Zhang LL, Lin YM: **Evaluation of the antioxidant activity of Syzygium cumini leaves**. *Molecules (Basel, Switzerland)* 2008, **13**(10):2545-2556.

18. Grover JK, Vats V, Rathi SS: **Anti-hyperglycemic effect of *Eugenia jambolana* and *Tinospora cordifolia* in experimental diabetes and their effects on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism.** *Journal of ethnopharmacology* 2000, **73**(3):461-470.
19. Sharma SB, Rajpoot R, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS: **Ameliorative Effect of Active Principle Isolated from Seeds of *Eugenia jambolana* on Carbohydrate Metabolism in Experimental Diabetes.** *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2011, **2011**:789871.
20. Ayyanar M, Subash-Babu P, Ignacimuthu S: ***Syzygium cumini* (L.) Skeels., a novel therapeutic agent for diabetes: folk medicinal and pharmacological evidences.** *Complementary therapies in medicine* 2013, **21**(3):232-243.
21. Baliga MS, Fernandes S, Thilakchand KR, D'Souza P, Rao S: **Scientific validation of the antidiabetic effects of *Syzygium jambolanum* DC (black plum), a traditional medicinal plant of India.** *Journal of alternative and complementary medicine (New York, NY)* 2013, **19**(3):191-197.
22. Sanches JR, Franca LM, Chagas VT, Gaspar RS, Dos Santos KA, Goncalves LM, Sloboda DM, Holloway AC, Dutra RP, Carneiro EM *et al*: **Polyphenol-Rich Extract of *Syzygium cumini* Leaf Dually Improves Peripheral Insulin Sensitivity and Pancreatic Islet Function in Monosodium L-Glutamate-Induced Obese Rats.** *Front Pharmacol* 2016, **7**:48.
23. Vikrant V, Grover JK, Tandon N, Rathi SS, Gupta N: **Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats.** *Journal of ethnopharmacology* 2001, **76**(2):139-143.
24. Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS, Dev G: **Hypoglycaemic and hypolipidemic effect of ethanolic extract of seeds of *Eugenia jambolana* in alloxan-induced diabetic rabbits.** *Journal of ethnopharmacology* 2003, **85**(2-3):201-206.
25. Sharma SB, Nasir A, Prabhu KM, Murthy PS: **Antihyperglycemic effect of the fruit-pulp of *Eugenia jambolana* in experimental diabetes mellitus.** *Journal of ethnopharmacology* 2006, **104**(3):367-373.
26. Frediani Brant NM, Mourao Gasparotto F, de Oliveira Araujo V, Christian Maraschin J, Lima Ribeiro Rde C, Botelho Lourenco EL, Cardozo Junior EL, Gasparotto Junior A: **Cardiovascular protective effects of *Casearia sylvestris* Swartz in Swiss and C57BL/6 LDLr-null mice undergoing high fat diet.** *Journal of ethnopharmacology* 2014, **154**(2):419-427.
27. Sharma B, Viswanath G, Salunke R, Roy P: **Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice.** *Food Chemistry* 2008, **110**(3):697-705.
28. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr.: **AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.** *J Nutr* 1993, **123**(11):1939-1951.
29. de Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, Coimbra CC: **The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex.** *Metabolic brain disease* 2008, **23**(4):361-373.
30. Pinto BA, Melo TM, Flister KF, Franca LM, Kajihara D, Tanaka LY, Laurindo FR, Paes AM: **Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats.** *Metabolic brain disease* 2016, **31**(4):917-927.
31. Bernardis LL, Patterson BD: **Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** *J Endocrinol* 1968, **40**(4):527-528.
32. Vaughan M: **The production and release of glycerol by adipose tissue incubated in vitro.** *The Journal of biological chemistry* 1962, **237**:3354-3358.

33. Merglen A, Theander S, Rubi B, Chaffard G, Wollheim CB, Maechler P: **Glucose sensitivity and metabolism-secretion coupling studied during two-year continuous culture in INS-1E insulinoma cells.** *Endocrinology* 2004, **145**(2):667-678.
34. Fernandes-Lima F, Monte TL, Nascimento FA, Gregorio BM: **Short Exposure to a High-Sucrose Diet and the First 'Hit' of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice.** *Cells, tissues, organs* 2016.
35. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y: **Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice.** *The Journal of nutrition* 2006, **136**(3):582-587.
36. Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M: **Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signalling and inflammation in mice.** *Diabetology & metabolic syndrome* 2012, **4**(1):32.
37. Franca LM, Freitas LN, Chagas VT, Coelho CF, Barroso WA, Costa GC, Silva LA, Debbas V, Laurindo FR, Paes AM: **Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation.** *Biochemical and biophysical research communications* 2014, **443**(2):725-730.
38. Schultz A, Barbosa-da-Silva S, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA: **Differences and similarities in hepatic lipogenesis, gluconeogenesis and oxidative imbalance in mice fed diets rich in fructose or sucrose.** *Food & function* 2015, **6**(5):1684-1691.
39. Hellgren MI, Daka B, Jansson PA, Lindblad U, Larsson CA: **Insulin resistance predicts early cardiovascular morbidity in men without diabetes mellitus, with effect modification by physical activity.** *European journal of preventive cardiology* 2015, **22**(7):940-949.
40. Morris JK, Vidoni ED, Perea RD, Rada R, Johnson DK, Lyons K, Pahwa R, Burns JM, Honea RA: **Insulin resistance and gray matter volume in neurodegenerative disease.** *Neuroscience* 2014, **270**:139-147.
41. Krentz AJ, Viljoen A, Sinclair A: **Insulin resistance: a risk marker for disease and disability in the older person.** *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2013, **30**(5):535-548.
42. Moreira PI, Sayre LM, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G: **Detection and localization of markers of oxidative stress by in situ methods: application in the study of Alzheimer disease.** *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2010, **610**:419-434.
43. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *The Journal of clinical investigation* 2004, **114**(12):1752-1761.
44. Rahmanto AS, Morgan PE, Hawkins CL, Davies MJ: **Cellular effects of peptide and protein hydroperoxides.** *Free radical biology & medicine* 2010, **48**(8):1071-1078.
45. Stanhope KL: **Role of fructose-containing sugars in the epidemics of obesity and metabolic syndrome.** *Annual review of medicine* 2012, **63**:329-343.
46. Drewnowski A, Bellisle F: **Liquid calories, sugar, and body weight.** *The American journal of clinical nutrition* 2007, **85**(3):651-661.
47. Ebbeling CB, Feldman HA, Osganian SK, Chomitz VR, Ellenbogen SJ, Ludwig DS: **Effects of decreasing sugar-sweetened beverage consumption on body weight in adolescents: a randomized, controlled pilot study.** *Pediatrics* 2006, **117**(3):673-680.
48. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: **Advanced glycation end-products: a review.** *Diabetologia* 2001, **44**(2):129-146.

49. Schalkwijk CG, Stehouwer CD, van Hinsbergh VW: **Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification.** *Diabetes/metabolism research and reviews* 2004, **20**(5):369-382.
50. Nseir W, Nassar F, Assy N: **Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease.** *World journal of gastroenterology* 2010, **16**(21):2579-2588.
51. Bunn HF, Higgins PJ: **Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance.** *Science (New York, NY)* 1981, **213**(4504):222-224.
52. Bose T, Chakraborti AS: **Fructose-induced structural and functional modifications of hemoglobin: implication for oxidative stress in diabetes mellitus.** *Biochimica et biophysica acta* 2008, **1780**(5):800-808.
53. Dragan S, Andrica F, Serban MC, Timar R: **Polyphenols-rich natural products for treatment of diabetes.** *Current medicinal chemistry* 2015, **22**(1):14-22.
54. Xiao JB, Hogger P: **Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives.** *Current medicinal chemistry* 2015, **22**(1):23-38.
55. Wolfram S: **Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health.** *Journal of the American College of Nutrition* 2007, **26**(4):373s-388s.
56. Hanhineva K, Torronen R, Bondia-Pons I, Pekkinen J, Kolehmainen M, Mykkanen H, Poutanen K: **Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism.** *International journal of molecular sciences* 2010, **11**(4):1365-1402.
57. Liu K, Zhou R, Wang B, Chen K, Shi LY, Zhu JD, Mi MT: **Effect of green tea on glucose control and insulin sensitivity: a meta-analysis of 17 randomized controlled trials.** *The American journal of clinical nutrition* 2013, **98**(2):340-348.
58. Liu IM, Tzeng TF, Liou SS, Lan TW: **Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats.** *Life sciences* 2007, **81**(21-22):1479-1488.
59. Bardy G, Virsolvy A, Quignard JF, Ravier MA, Bertrand G, Dalle S, Cros G, Magous R, Richard S, Oiry C: **Quercetin induces insulin secretion by direct activation of L-type calcium channels in pancreatic beta cells.** *British journal of pharmacology* 2013, **169**(5):1102-1113.
60. Fusi F, Saponara S, Frosini M, Gorelli B, Sgaragli G: **L-type Ca<sup>2+</sup> channels activation and contraction elicited by myricetin on vascular smooth muscles.** *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2003, **368**(6):470-478.