

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria
jaboticaba* (Vell.) Berg.) SOBRE ESTRESSE
OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM
RATOS**

DISERTAÇÃO DE MESTRADO

Andréia Quatrin

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

**EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba*
(Vell.) Berg.) SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM MODELO DE DIABETES *MELLITUS*
TIPO 2 EM RATOS**

Andréia Quatrin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof^a Tatiana Emanuelli

**Santa Maria, RS, Brasil
2014**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Quatrin, Andréia

Efeito da casca de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) sobre estresse oxidativo e resposta inflamatória em modelo de diabetes mellitus tipo 2 em ratos. / Andréia Quatrin.-2014.

82 p.; 30cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Jaboticaba 2. Diabetes 3. Resistência à insulina
4. Inflamação 5. Estresse oxidativo I. Emanuelli,
Tatiana II. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Andréia Quatrin. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: quatrinandreia@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.)
Berg.) SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA
INFLAMATÓRIA EM MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM
RATOS**

elaborado por
Andréia Quatrin

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Tatiana Emanuelli, Dr^a.
(Presidente/Orientador)

Greicy Michelle Marafiga Conterato Dr^a. (UNOCHAPECÓ)

Maria Beatriz Moretto Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 14 de março de 2014

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me incentivaram e
contribuíram na concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar nas minhas escolhas, pelas oportunidades e por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus amados pais, Celso e Zélia, por todo o apoio emocional, pela força, pelo amor e principalmente pelos ensinamentos de vida. Amo muito vocês. Ao meu irmão Adilson, pela companhia e por sempre se preocupar e me auxiliar quando preciso.

Ao meu namorado Cássio, pela paciência, convívio, compreensão, apoio e toda a ajuda com a informática.

À minha orientadora Tatiana Emanuelli, por todo o apoio, confiança e os ensinamentos conferidos durante todos estes anos de aprendizado. Também pelo grande exemplo de profissional e pessoa que és.

Aos amigos e colegas do NIDAL que colaboraram muito com toda a parte experimental do trabalho, Cassieli G. Figueiredo, Lisiane Conte, Dariane T. da Silva, Matheus T. Veigas, Sabrina Somacal e Miguel Roehrs aqui os meus sinceros agradecimentos pela imensa ajuda.

Ao professor Mário R. Maróstica Júnior pelo fornecimento da jabuticaba e por toda a ajuda conferida ao trabalho, à professora Marta Duarte pela ajuda com os parâmetros inflamatórios, bem como ao professor Marcelo L. da Veiga e a aluna Alessandra L. del Castillo pela contribuição nas análises histológicas.

Ao professor Rafael N. Moresco e a aluna Etiane Tatsch pela contribuição nas análises de estresse oxidativo.

As colegas que sempre me incentivaram e por todo o ensinamento conferido desde a iniciação científica Greicy M. M. Conterato, Sabrina Somacal, Ana Paula de L. Vecck e Ana Paula Daniel, bem como um agradecimento especial a amiga Paula R. Augusti pelo imenso ensinamento, pelo grande incentivo e ajuda conferida com as correções do inglês.

A todos os amigos e colegas do NIDAL, em especial Jaqueline, Carlos, Luana e Miguel pela ajuda no deslocamento até o biotério e pelo apoio, à Mariane, Prof. Laerte e Luciano pela ajuda com as análises e empréstimo de materiais, também pelo companheirismo, apoio, risadas e amizade dos colegas Juliana, Cristiane, Graziela, Bruna M., Bruna K., Aline, Diego e Amanda.

Às professoras Greicy M. M. Conterato, Maria B. Moretto e Roselei Fachinetto por aceitarem o convite para compor a banca examinadora dessa dissertação.

Ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia em especial ao professor Carlos Mello por todo o ensinamento, disponibilidade e pela ajuda com o empréstimo de material.

À Universidade Federal de Santa Maria, por possibilitar minha pós-graduação em uma universidade pública e de tamanha excelência e a CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO DA CASCA DE JABUTICABA (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) SOBRE ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MODELO DE DIABETES *MELLITUS* TIPO 2 EM RATOS

AUTORA: ANDRÉIA QUATRIN

ORIENTADOR: TATIANA EMANUELLI

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2014.

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença multifatorial caracterizada principalmente por distúrbios metabólicos relacionados à insulina. A hiperglicemia é uma das causas da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que leva ao estresse oxidativo. Além disso, o DM2 está associado a aumento da resposta inflamatória. Há uma intensa busca por novos medicamentos terapêuticos, pois os medicamentos sintéticos utilizados atualmente apresentam efeitos adversos e tem sua eficácia reduzida ao longo do tempo de uso. O pó de casca de jaboticaba (JAB) (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) apresenta alta capacidade antioxidante e ação anti-inflamatória devido à presença de polifenóis. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do JAB em prevenir alterações bioquímicas, estresse oxidativo resposta inflamatória e dano pancreático em modelo de DM2 induzido por dieta hipercalórica e administração única de estreptozotocina (STZ, 35 mg/kg) em ratos Wistar. Após indução do DM2, em vez de água potável, os animais receberam veículo (água acrescida de 0,5% de carboximetilcelulose) ou JAB em 2,7 (JAB-I), 5,4 (JAB-II) e 10,8 (JAB-III) g/L (equivalente a 0,07, 0,14 and 0,28 g antocianinas/L, respectivamente). Após 8 semanas de tratamento os animais foram mortos para avaliar a glicemia, insulinemia, estresse oxidativo e marcadores inflamatórios avaliados no soro, além da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas no sangue total e as alterações histológicas no tecido pancreático. O aumento da glicemia e dos níveis de frutossamina, resistência à insulina e gordura epididimal foram observados em ratos com DM2, além da redução do número e área das ilhotas pancreáticas. Todas as doses do JAB preveniram o aumento da glicemia ao longo do tempo, enquanto que JAB-III também reduziu os níveis de glicemia final, frutossamina e a resistência a insulina. JAB-I e JAB-II preveniram o ganho de peso corporal ao longo do experimento, enquanto que JAB-I também reduziu a quantidade de gordura epididimal. Além disso, JAB-I e JAB-III aumentaram a área das ilhotas pancreáticas dos ratos diabéticos. Adicionalmente, os tratamentos JAB-II e JAB-III reduziram os níveis de LDL oxidada, enquanto que o tratamento JAB-II também reduziu a oxidação proteica em ratos diabéticos. O tratamento com JAB também preveniu a redução nas atividades das enzimas glutatona peroxidase, catalase e tiorredoxina redutase nos ratos diabéticos, mas não alterou a redução na atividade da superóxido dismutase. Apenas o tratamento JAB-III preveniu o aumento dos marcadores inflamatórios (IL-6, IL-1 e TNF- α) induzidos no diabetes. Estes resultados sugerem que JAB poderia ter um efeito benéfico contra o diabetes, reduzindo a hiperglicemia, a resistência à insulina, estresse oxidativo e resposta inflamatória, além de diminuir o dano pancreático.

Palavras-chave: Jaboticaba. Diabetes. Resistência à insulina. Inflamação. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master Course Dissertation
Graduate Program on Pharmacology
Federal University of Santa Maria

EFFECT OF JABOTICABA (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) ON THE OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN TYPE 2 DIABETES *MELLITUS* IN RAT MODEL

AUTHOR: ANDRÉIA QUATRIN

ADVISER: TATIANA EMANUELLI

Defense Place and Date: Santa Maria, March 14th, 2014.

Type 2 diabetes *mellitus* (DM2) is a multifactorial disease mainly characterized by metabolic disorders related to insulin. Hyperglycemia is one of the causes of excessive generation of reactive oxygen species (ROS) leading to oxidative stress. In addition, DM2 is associated with increased inflammatory response. There is an intensive search for novel therapeutic drugs because the synthetic drugs currently used have side-effects and have their effectiveness reduced along the time of use. The jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg) peel powder (JAB) exhibit high antioxidant capacity and anti-inflammatory action due to the presence of polyphenols. The aim of this study was to evaluate the potential of JAB to prevent biochemical changes, oxidative stress, inflammatory response and pancreatic damage in a DM2 model induced by high-fat diet and a singular injection of streptozotocin (STZ; 35 mg/kg) in Wistar rats. After DM2 induction, instead of drinking water, the animals received vehicle (water containing 0.5% carboxymethyl cellulose) or JAB at 2.7 (JAB-I), 5.4 (JAB-II) or 10.8 (JAB-III) g/L of drinking water (equivalent to 0.07, 0.14 and 0.28 g anthocyanins/L, respectively). After 8 weeks of treatment animals were killed to evaluate the glycemia, insulinemia, oxidative stress and inflammatory markers were evaluated in the serum, besides antioxidant enzymes activities were evaluated in the blood and the histological changes in pancreatic tissue. Increased glycemia and fructosamine levels, insulin resistance and epididymal fat were observed in the DM2 rats beyond decreased number and area of pancreatic islets. All JAB doses prevented the increase in glycemia over time, whereas JAB-III also reduced the end glycemia, fructosamine levels and the insulin resistance. JAB-I and JAB-II prevented body weight gain over the experiment, whereas JAB-I also decreased the amount of epididymal fat. Furthermore, JAB-I and JAB-III increased the area of pancreatic islets of diabetic rats. In addition, JAB-II and JAB-III treatment reduced the levels of oxidized LDL, whereas JAB-II treatment also reduced protein oxidation in diabetic rats. JAB treatment also prevented the decrease in the activities of glutathione peroxidase, catalase and thioredoxin reductase in the diabetic rats but did not change the decrease in the activity of superoxide dismutase. Only JAB-III treatment prevented the diabetes-induced increase in the inflammatory markers (IL-6, IL-1 and TNF- α). These findings suggest that JAB could have a beneficial effect against diabetes, reducing the hyperglycemia, the insulin resistance, oxidative stress and inflammatory response, besides decreasing pancreatic damage.

Key-words: Jaboticaba. Diabetes. Insulin resistance. Inflammation. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular de insulina.	18
Figura 2: Alterações metabólicas do diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	20
Figura 3: Representação esquemática do estado hiperglicêmico e suas consequências.....	23
Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da via sensível ao estresse e defesa antioxidante enzimática.	25
Figura 5: Representação esquemática da ativação do NF- κ B	27
Figura 6: Esquema dos efeitos crônicos do estresse oxidativo no diabetes <i>mellitus</i> tipo 2, ativação de vias sensíveis e sinalização da insulina.	29
Figura 7: Fotografia da jaboticaba (<i>M. cauliflora</i>) (A) e fotografia da jaboticaba (<i>M. jaboticaba</i>) (B).	33
Figura 8: Antocianinas e flavonoides identificados na jaboticaba	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AOPP- Produtos avançados de oxidação de proteínas
- AGL- Ácidos graxos livres
- AGE- Produtos finais de glicação avançada
- AMPK - Proteína quinase
- ANOVA - Análise de variância
- CAT- Catalase
- Cu/Zn SOD - Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
- DAG - Diacilglicerol
- DM - Diabetes *mellitus*
- DM1- Diabetes *mellitus* tipo 1
- DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- GLUT 2- Transportador de glicose tipo 2
- GLUT 4- Transportador de glicose tipo 4
- GR - Glutaciona redutase
- GSH - Glutaciona reduzida
- GPx - Glutaciona peroxidase
- HDL - Lipoproteína de alta densidade
- HOCl - Ácido hipocloroso
- HbA1c - Hemoglobina glicada
- IDDM - Diabetes *mellitus* insulino dependente
- IRS - Substratos do receptor de insulina
- JAB - Pó da casca de jaboticaba
- JNK - c-Jun amino terminal quinase
- IL-6 - Interleucina 6
- IL-1 - Interleucina 1
- IKK β - Complexo I κ B quinase tipo beta
- I κ B - α – Proteína inibitória tipo alfa
- LPL - Lipase lipoproteica
- LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MCP-1 - Proteína quimiotática para macrófago
Mg SOD - Superóxido dismutase dependente de manganês
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB - Fator nuclear kappa B
NIDDM - Diabetes *mellitus* não insulino dependente
•NO - Óxido nítrico
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
ONOO⁻ - Peroxinitrito
O₂^{•-} - Ânion radical superóxido
•OH - Radical hidroxil
ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio
PI3 - quinase - Fosfatidilinositol 3-quinase
PKC - Proteína quinase C
PCR - Proteína C reativa
PPAR-γ - Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma tipo gama
RAGE- Receptor de produtos finais de glicação avançada
SH2- Domínios com homologia Src2
SOD- Superóxido dismutase
STZ - Estreptozotocina
TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúico
TEAC - Capacidade antioxidante equivalente ao trolox
Trx - Proteína tiorredoxina
TrxR-1 - Tiorredoxina redutase
TNF-α - Fator de necrose tumoral tipo alfa
VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Epidemiologia do diabetes	15
1.2 Diabetes <i>mellitus</i>	15
1.2.1 Sinalização intracelular da insulina	17
1.2.2 Resistência à insulina.....	18
1.2.3 Características gerais e alterações metabólicas do diabetes tipo 2.....	19
1.2.4 Estresse oxidativo e diabetes	21
1.2.5 Inflamação e diabetes	26
1.3 Modelos experimentais de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	29
1.4 Terapêutica	30
1.5 Jaboticaba	32
1.5.1 Antocianinas no tratamento do diabetes.....	35
1.5.2 Absorção e biotransformação das antocianinas.....	36
2. OBJETIVO	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. MANUSCRITO 1: Jaboticaba (<i>Myrciaria jaboticaba</i> (Vell.) Berg.) peel improves inflammatory and oxidative stress markers in animal model of type 2 diabetes	39
4. CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

APRESENTAÇÃO

A presente Dissertação de Mestrado encontra-se organizada em quatro partes:

A primeira parte representa a **Introdução**, a qual contém o referencial teórico utilizado para a construção das hipóteses investigadas nesta Dissertação. Seguida da segunda parte os **Objetivos** que englobam objetivo Geral e objetivos Específicos.

A terceira parte contém os **Resultados** que fazem parte deste trabalho, apresentados sob a forma de um manuscrito, já submetido à publicação. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontra-se no próprio manuscrito e representam na íntegra este estudo.

A quarta parte abrange **Conclusão**, que contém um resumo dos principais resultados da Dissertação. A seção **Referências Bibliográficas** apresenta a bibliografia citada na seção **Introdução** desta Dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do diabetes

A crescente prevalência do diabetes *mellitus* (DM) em todo o mundo é um dos mais graves e desafiadores problemas de saúde pública do século XXI. Este aumento no número de casos se deve ao crescimento e envelhecimento da população, ao processo de urbanização e ao grande número de casos de obesidade aliado ao sedentarismo. Em 1995, estimava-se haver 135 milhões de adultos com diabetes; esse número cresceu para 173 milhões em 2002, atingindo em 2013 cerca de 382 milhões de pacientes diabéticos no mundo, dos quais 46% desconhecem que apresentam a doença. A prevalência do diabetes é maior nas populações de classe baixa e média, atingindo um percentual de 80 % do número de casos, além disso, as pessoas socialmente desfavorecidas são as mais vulneráveis a doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

As projeções da Federação Internacional de Diabetes para 2035 sugerem que o número de casos de DM possa chegar a 592 milhões (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013), e que o diabetes se tornará a sétima causa de morte no mundo em 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a). Na América do Sul e América Central no ano de 2013 estimou-se que 8% da população adulta era diabética, sendo que o maior número de casos da doença está no Brasil (11,9 milhões), seguido por Colômbia (2.1 milhões), Argentina (1.6 milhões) e Chile (1.3 milhões) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Além disso, as despesas com saúde relacionadas particularmente a patologia do DM estão em ascensão. Em 2013 gastou-se 548 milhões de dólares e o número de mortes devido ao diabetes atingiu 5,1 milhões de casos no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

1.2 Diabetes *mellitus*

O DM é uma síndrome que se manifesta através de um grupo de desordens metabólicas, caracterizadas por hiperglicemia e intolerância à glicose, devido à deficiência de insulina, deficiência na ação da insulina ou ambos (WORLD HEALTH ORGANIZATION,

2013b). Com base na etiologia, o DM é classificado em: tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos específicos de DM.

O DM tipo 1 (DM1) antigamente denominado de diabetes *mellitus* insulino dependente (IDDM) representa cerca de 5% dos casos, geralmente acomete mais crianças e adultos jovens. É considerada uma doença autoimune clássica, onde qualquer estímulo ambiental funciona como um gatilho e o resultado é a ativação de células do sistema imunológico com uma especificidade única para destruição das células β pancreáticas, interrompendo a secreção de insulina (CNOP et al., 2005). Infecções virais também podem ativar o processo autoimune característico do DM1. Além da origem etiológica do diabetes imunomediado, o DM1 pode não ter nenhuma causa conhecida, chamado de idiopático, onde alguns destes pacientes têm graus variados de deficiência de insulina, são propensos a cetoacidose e apresentam insulinopenia permanente (CNOP et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013b).

O DM gestacional é caracterizado por qualquer intolerância a glicose variável, com primeiro diagnóstico durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013a). Outros tipos específicos de DM são causados por defeitos genéticos na função das células β pancreáticas ou na ação da insulina, por doenças do pâncreas exócrino e por medicamentos, que podem induzir quimicamente o DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013b).

O DM2 antigamente denominado de diabetes *mellitus* não insulino dependente (NIDDM) é considerado o tipo mais comum da doença, pois abrange cerca de 90 % dos casos de DM, sendo mais comum em pessoas com idade superior a 40 anos que apresentam sobrepeso ou obesidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os pacientes não dependem de insulina exógena para viver, mas podem necessitar de tratamento com insulina para obter controle metabólico adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Existem evidências de que dietas ocidentais (ricas em carboidratos, gorduras saturadas e carnes) aumentam o risco de desenvolver DM2, enquanto que dietas orientais (ricas em legumes e frutas) reduzem este risco (VAN DAM et al., 2002).

O diabetes está associado a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, afetando especialmente os sistemas oftalmológico, renal, neurológico e cardiovascular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Com o objetivo de prevenir de maneira eficaz as complicações macrovasculares e microvasculares do DM, a Associação Americana de Diabetes e a Sociedade Brasileira de

Diabetes recomendam critérios de diagnóstico sintomático e laboratoriais. Estes critérios são (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009):

- Sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso ponderal,
- Glicose casual acima de 200 mg/dL;
- Glicemia de jejum igual ou superior a 126 mg/dL, confirmado por uma nova glicemia de jejum em dias diferentes;
- Glicemia após teste oral de tolerância a glicose acima de 200 mg/dL;
- Hemoglobina glicada (HbA1c) maior que 6,5% a ser confirmada por outra coleta.

1.2.1 Sinalização intracelular da insulina

A captação normal de glicose pelas células/tecidos é regulada pela liberação de insulina. A glicose circulante promove a sinalização para liberação de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, via transportador GLUT 2, o qual apresenta uma afinidade relativamente baixa por glicose. Assim, flutuações na glicemia estimulam a produção e liberação de insulina na corrente sanguínea. Em indivíduos saudáveis o balanço entre a produção e utilização de glicose é mantido em equilíbrio pela liberação dos hormônios insulina (estado alimentado) e glucagon (jejum) pelo pâncreas (SALTIEL, 2001). Para que a glicose seja captada pra dentro da célula ocorre uma sinalização intracelular com a ligação de insulina ao seu receptor presente nos tecidos alvo. O receptor de insulina é uma proteína heterotetramérica (2 subunidades α e 2 subunidades β) com atividade quinase intrínseca, que ao ligar insulina sofre uma alteração conformacional e autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina das subunidades β . Ele então fosforila resíduos de tirosina dos substratos do receptor de insulina (IRS) dentre outros substratos. A fosforilação dos IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2), dentre as quais se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). A estimulação da PI 3-quinase promove sinalizações adjacentes, que levam a translocação do receptor de glicose GLUT 4 para a superfície do tecido (membrana plasmática), promovendo assim a captação de glicose pelo tecido (MOHD-RADZMAN et al., 2013; SESTI, 2006), demonstrado na figura 1.

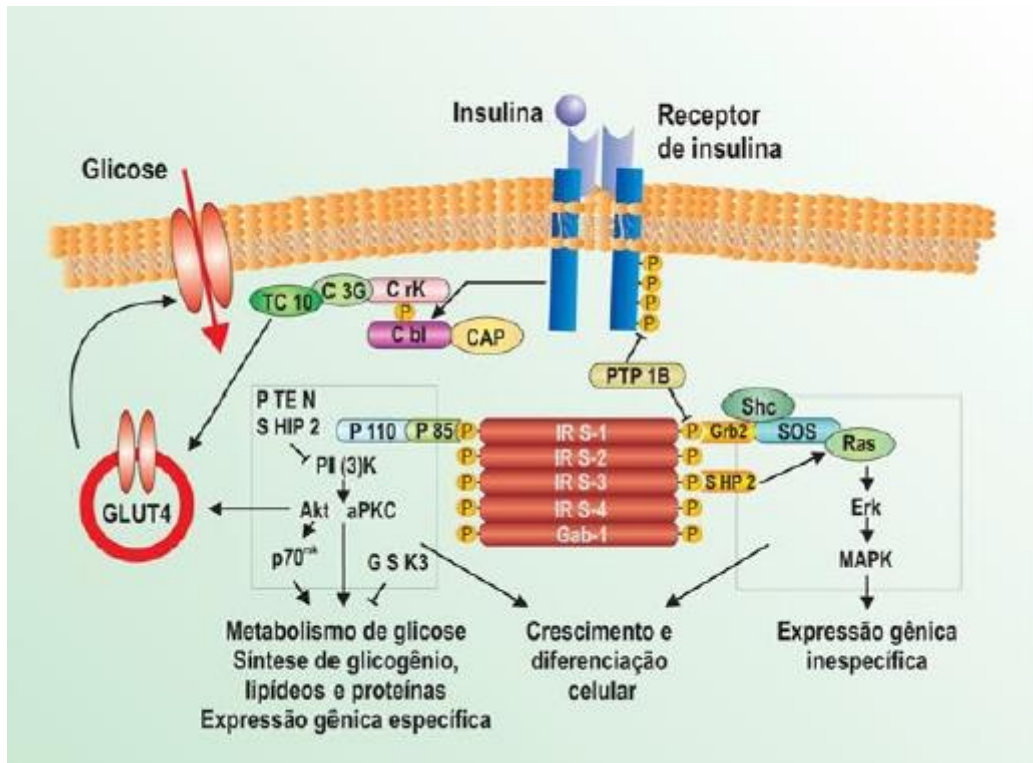


Figura 1: Esquema simplificado das etapas de sinalização intracelular de insulina. IRS (1-4) = substrato de receptor de insulina; PI(3)K= fosfatidilinositol 3-quinase; P110 e P85= dímeros da subunidade catalítica e regulatória da PI(3)K; aPKC e AKt = serina/treonina quinase; Cbl= protooncogene; CAP = proteína adaptadora; C3G= proteína; TC10= proteína; MAPK= MAP (mitogen-activated protein) quinase.

Fonte: Saad e Zecchin (2011).

1.2.2 Resistência à insulina

A resistência à insulina é definida como uma resposta inadequada dos tecidos sensíveis à insulina. Os tecidos muscular, hepático e adiposo sofrem a ação prejudicada/diminuída da insulina sobre a estimulação da captação de glicose em presença de níveis normais de insulina (SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008).

A resistência à insulina pode persistir por vários anos com níveis normais de glicose sérica, devido ao aumento compensatório da produção e secreção de insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas, promovendo a característica hiperinsulinemia compensatória. A resistência à insulina pode progredir para o DM2, com a exaustão do pâncreas em produzir e secretar insulina.

O desenvolvimento da resistência à insulina está sendo fortemente relacionado com o envelhecimento, estilo de vida sedentário, predisposição genética e especialmente com a obesidade (LEAHY, 2005). Daousi e colaboradores (2006) demonstraram que 86% dos

pacientes diabéticos tipo 2 apresentam sobrepeso ou obesidade, sendo que destes 52% apresentam obesidade e cerca de 8% obesidade mórbida (DAOUSI et al., 2006). A resistência à insulina associada a obesidade e ao consumo de dieta gordurosa pode ser mediada por altos níveis de ácidos graxos livres (AGL) e a inflamação crônica de baixo grau. Através do estímulo de vias intracelulares I κ B quinase- β (IKK β)/fator nuclear- κ B (NF- κ B) e c-Jun amino terminal quinase (JNK) nos tecidos adiposo, hepático e macrófagos, ocorre a ativação do IKK β , que resulta na translocação do NF- κ B estimulando o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 que contribuem para a resistência a insulina. Além disso, altos níveis de citocinas inflamatórias estão relacionados com alteração da transmissão do sinal de insulina, por meio da ativação da via JNK que leva ao aumento da fosforilação de resíduos de serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), bem como de outras proteínas da família IRS. A fosforilação de resíduos de serina inibe a atividade tirosina quinase do receptor de insulina, que é também menos fosforilado em resíduos de tirosina, impedindo, assim, a propagação do sinal, o que bloqueia a entrada de glicose no tecido (SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Adicionalmente, a lipólise aumentada no tecido adiposo resulta na liberação de altos níveis de ácidos graxos livres na circulação, o que contribui para o desenvolvimento da resistência a insulina. Os ácidos graxos livres ativam a proteína quinase C, que fosforila resíduos de serina do IRS-1, reduzindo a capacidade do IRS-1 de se ligar e ativar a PI 3-quinase que por sua vez reduz a translocação do receptor de glicose (GLUT 4) para a superfície, etapa que limita a propagação do sinal da insulina e consequentemente prejudica o transporte de glicose para dentro da célula (YU et al., 2002).

1.2.3 Características gerais e alterações metabólicas do diabetes tipo 2

O DM2 caracteriza-se por graus variáveis de resistência tecidual à insulina e uma deficiência relativa na secreção desse hormônio pelas células β pancreáticas, atingindo mais adultos (LEAHY, 2005). No entanto, a prevalência do DM2 está se tornando maior em crianças e adultos jovens, devido à maior taxa de obesidade nessas populações (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013b). Conforme a WHO (2013), o DM2 em alguns países é responsável por quase metade dos novos casos de DM diagnosticados em crianças e adolescentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013a).

A disfunção na resposta fisiológica à insulina característica do DM2 provoca alterações metabólicas. O defeito na ação da insulina impede que a mesma suprima adequadamente a gliconeogênese e a glicogenólise, o que aumenta a glicemia e resulta em

hiperinsulinemia compensatória (SALTIEL, 2001) até a exaustão progressiva das células β pancreáticas. Quando os níveis de insulina não conseguem compensar a resistência à insulina, a glicemia se eleva e o diagnóstico do diabetes pode ser realizado (LEAHY, 2005) (Figura 2). A massa de células β está reduzida a cerca de 50% no DM2 (BUTLER et al., 2003), entretanto acredita-se que o fator que contribui para a diminuição da liberação de insulina no DM2 é a redução da função das células β , a qual é compatível com a falha em responder adequadamente às estimulações secretagogas (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). O DM2 é uma doença progressiva, onde níveis elevados de glicose no sangue contribuem para a progressão da doença através de efeitos glicotóxicos sobre as células β , levando ao contínuo declínio da sua função, que tem início anos antes da constatação da doença (KAHN, 2001).

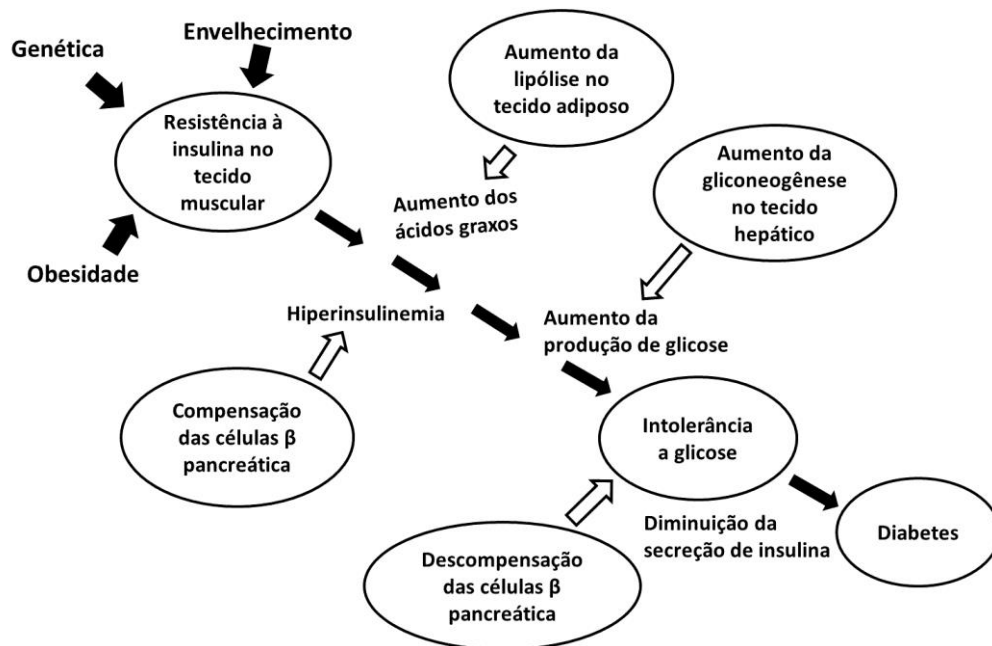


Figura 2: Alterações metabólicas do diabetes *mellitus* tipo 2
Fonte: Adaptado de Saltiel (2001).

A insulina apresenta função importante na regulação do metabolismo lipídico (VERGÈS, 2005). Assim, a dislipidemia é característica do DM2. Pacientes diabéticos apresentam dislipidemia caracterizada por altos níveis de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL), além de baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL), e esta dislipidemia correlaciona-se com o descontrole glicêmico e o tempo de duração do diabetes (KARIM et al., 2013).

A presença de hipertrigliceridemia (VLDL) no DM2 é devido a desregulação da síntese de VLDL hepática, decorrente da resistência à insulina. Além disso, a sinalização prejudicada da insulina inibe a lipase lipoproteica (LPL), enzima que catalisa a quebra de VLDL em ácidos graxos livres e triglicerídeos, o que contribui para o aumento dos níveis de VLDL, cujo maior constituinte é o triglicerídeo, e diminuição dos níveis de colesterol HDL devido ao aumento do catabolismo pela lipase hepática (VERGÈS, 2005).

Além disso, a resistência à insulina prejudica sua capacidade de inibir a lipólise no tecido adiposo, o que leva ao aumento no fluxo de ácidos graxos oriundos deste tecido (SALTIEL, 2001). No estado pós-prandial foi observado aumento dos níveis de quilomicros maior em pacientes diabéticos obesos do que em pacientes obesos, devido a inibição da LPL do tecido adiposo relacionado ao diabetes e elevação dos níveis de VLDL similares em ambos os grupos, devido a resistência à insulina (ANNUZZI et al., 2008).

Devido ao aumento dos níveis de triglicerídeos, a proteína transferidora de ésteres de colesterol é estimulada e promove a transferência de triglicerídeos para a LDL que se torna substrato para a lipase hepática. O estímulo da lipase hepática favorece a formação de partículas pequenas de LDL no diabetes (VERGÈS, 2005).

1.2.4 Estresse oxidativo e diabetes

O estresse oxidativo está envolvido no desenvolvimento do DM e de suas complicações (RAINS; JAIN, 2011). O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e o sistema de defesa antioxidante de um organismo. As espécies reativas englobam radicais livres, que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, e espécies que não apresentam elétrons desemparelhados, porém são bastante reativas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentam elétrons desemparelhados no átomo de oxigênio, enquanto as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) apresentam elétrons desemparelhados no átomo de nitrogênio. Quando em equilíbrio, sob condições fisiológicas normais, as EROs e ERNs desempenham papéis fisiológicos importantes para manter as funções celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Entretanto, o desequilíbrio entre as espécies reativas e defesas antioxidantes estão envolvidos em muitas patologias como, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes e câncer (MATSUDA; SHIMOMURA, 2013; MEHTA et al., 2006). As principais EROs e ERNs envolvidas nos processos patológicos são: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o

ácido hipocloroso (HOCl) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Devido a alta reatividade de as espécies reativas podem reagir com outras biomoléculas como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (KASSAB; PIWOWAR, 2012; VALKO et al., 2007).

Quando instaurado o estresse oxidativo todos os componentes celulares podem sofrer o ataque de espécies reativas, mas as membranas celulares são as mais suscetíveis a peroxidação lipídica decorrente da ação dos EROs sobre ácidos graxos poli-insaturados formando hidroperóxidos. Essa modificação altera a fluidez e a atividade secretora da membrana, podendo levar a morte celular (VASCONCELOS et al., 2007). As EROs podem atacar ainda lipídios presentes em outras estruturas, como a lipoproteína LDL, resultando na oxidação da sua fração lipídica e inclusive da fração proteica, podendo haver modificação da apolipoproteína B (MATSUURA; HUGHES; KHAMASHTA, 2008; YOSHIDA; KISUGI, 2010).

O excesso de EROs também pode atacar proteínas resultando na sua fragmentação, modificação da hidrofobicidade, oxidação das cadeias laterais de aminoácidos e formação de novos grupamentos, tais como os grupamentos carbonilas (HAWKINS; DAVIES, 2001). Assim, a oxidação proteica pode ser avaliada pela quantificação de grupos carbonila em proteínas (LEVINE et al., 1990), bem como de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), reação que avalia a formação de agregados de albumina resultantes da oxidação, envolvendo a detecção de vários grupos cromóforos, tais como carbonila, pentosidina e ligações cruzadas do tipo ditirosina (CAPEILLÈRE-BLANDIN et al., 2004). Altos níveis de carbonilação proteica e AOPP estão fortemente relacionados ao diabetes (NARASIMHAN et al., 2010) e suas complicações (MARTÍN-GALLÁN et al., 2003).

No DM2, o aumento da glicemia resulta na geração de EROs, que juntamente com uma deficiência das defesas antioxidantes levam ao estresse oxidativo em vários tecidos (EVANS, 2002). Os mecanismos pelos quais o estresse oxidativo está envolvido nas complicações diabéticas são parcialmente conhecidos. Acredita-se que uma das principais fontes de radicais livres seja a oxidação da glicose. Várias vias de produção de radicais livres estão relacionadas à hiperglicemia, sendo implicadas na patologia do DM: a via dos poliois; produtos de Amadori e produtos finais de glicação avançada (AGEs); proteína quinase C (PKC); hexosamina; e a superprodução de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (Figura 3).

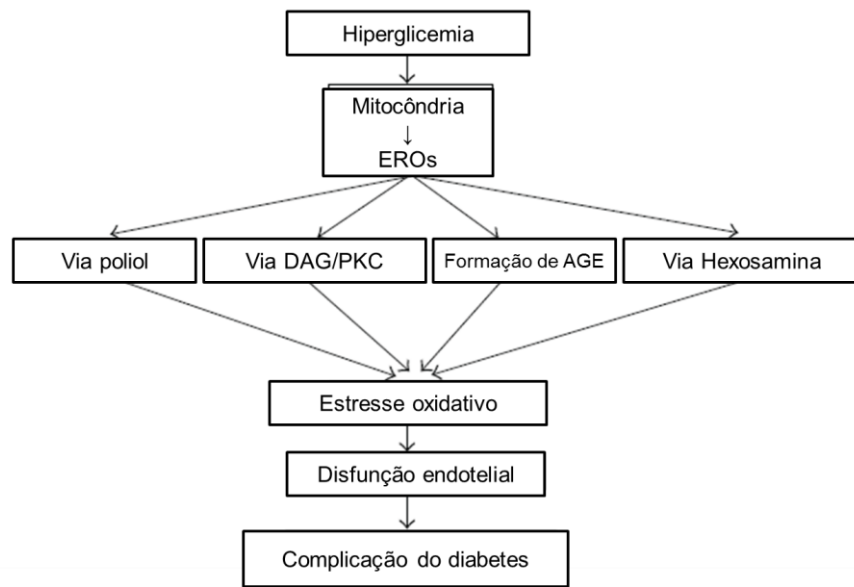


Figura 3: Representação esquemática do estado hiperglicêmico e suas consequências. DAG= diacilglicerol; PKC= proteína quinase C; EROs= espécies reativas de oxigênio; AGE= produtos finais de glicação avançada.

Fonte: Adaptado de van den Oever et al. (2010).

Em condições de hiperglicemia o número de substratos que entram no ciclo de Krebs é maior e, por conseguinte o número de equivalentes redutores que entram cadeia de transporte de elétrons mitocondrial também é aumentado, resultando em um aumento na produção de ânion radical superóxido (BROWNLEE, 2001; GIACCO; BROWNLEE, 2010).

A via dos poliois, consiste na oxidação da glicose a sorbitol por meio da ativação da enzima aldolase redutase. A atividade excessiva desta enzima provoca depleção de NADPH. Como a enzima glutatona redutase (GR) também é dependente de NADPH, a sua depleção prejudica a regeneração da glutatona (GSH) contribuindo para um desequilíbrio redox global na célula, o que leva ao estresse oxidativo (BROWNLEE, 2001).

Outra via importante é a interação da glicose com proteínas levando a formação de produtos de Amadori e então a AGEs. Estes últimos modificam proteínas intra e extracelulares e ligam-se a receptores específicos denominados receptores para produtos finais de glicação avançada (RAGE), ativando células inflamatórias, como monócitos, macrófagos, células endoteliais e células mesangiais (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004). A ligação dos AGEs com RAGE é considerado o principal processo responsável pela geração de EROs e ativação de fatores de transcrição nucleares que resultam na expressão de genes envolvidos na inflamação vascular e disfunção endotelial (BASTA et al., 2002).

O excesso de glicose intracelular resulta na ativação da proteína quinase C (PKC), contribuindo de forma direta para a produção de EROs, através da ativação do segundo mensageiro lipídico diacilglicerol (DAG) (DAS EVCIMEN; KING, 2007) e de forma indireta através da ativação da ligação dos AGEs ao RAGE. Ambos levam a um aumento das EROs e de expressão de uma variedade de genes pró-inflamatórios (BROWNLEE, 2001).

A via hexosamina é uma via adicional do metabolismo da glicose, quando em condições normais, 2 a 5% da glicose entra nas células pela via hexosamina através da ação da enzima glutamina: frutose 6-fostato amidotransferase que converte frutose-6-fostato em glicosamina 6-fostato. O produto final uridina difosfato-N-acetil glicosamina é o substrato para a glicosilação de diversas proteínas citoplasmáticas e nucleares por meio da transferência de N-acetil glicosamina para resíduos de serina e treonina das mesmas (BUSE, 2007). Adicionalmente, alta concentração de glicose intracelular ativa a via hexosamina que promove a glicosilação de fatores intracelulares incluindo fatores de transcrição aumentando a expressão de muitos genes como inibidores da ativação de plasminogênio-1 resultando em complicações do DM (BROWNLEE, 2001; GIACCO; BROWNLEE, 2010). Além disso, a ativação da via hexosamina prejudica a sinalização da insulina devido a glicosilação dos IRS e de fatores subsequentes da sinalização que resultam em translocação diminuída do GLUT 4 (TEO; WOLLASTON-HAYDEN; WELLS, 2010).

Entretanto, o estresse oxidativo pode ser minimizado por mecanismos de defesa enzimática e não enzimática que neutralizam as espécies reativas geradas em excesso. As principais enzimas envolvidas na defesa enzimática são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), tioredoxina redutase (TrxR-1) e glutatona redutase (GR), que constituem a primeira linha de defesa contra as EROs.

A SOD é uma metaloenzima, encontrada sob três isoformas nos mamíferos as isoformas SOD citosólica e SOD extracelular são dependentes de cobre e zinco (Cu/Zn SOD) e a SOD intracelular é dependente de manganês (MgSOD) encontrada nas mitocôndrias. Todas as isoformas mesmo sendo produtos de genes distintos catalisam a mesma reação de remoção do radical $O_2^{\bullet-}$ dismutando-o em H_2O_2 rapidamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O H_2O_2 , que também é reativo pode ser detoxificado em água e oxigênio pelas enzimas CAT, GPx e TrxR-1 (Figura 4).

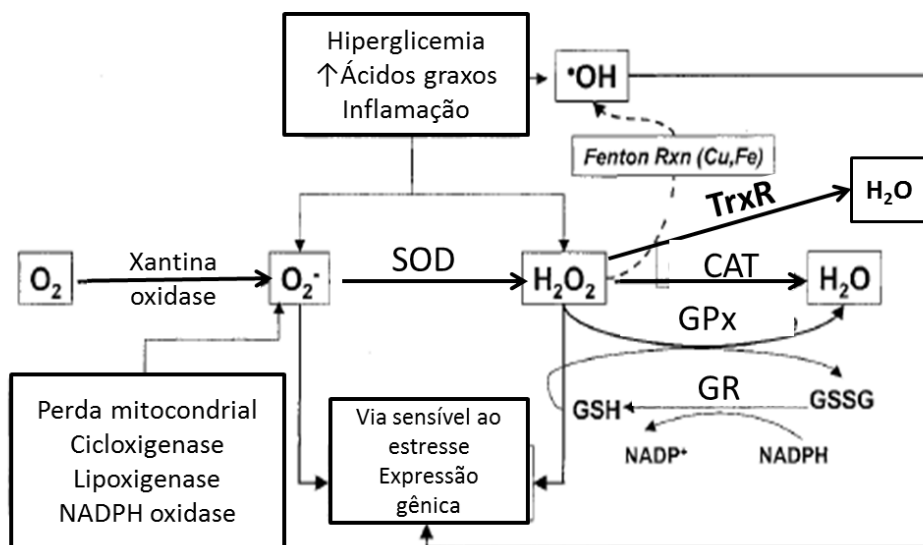


Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da via sensível ao estresse e defesa antioxidante enzimática. $O_2^{\bullet-}$ = ânion radical superóxido; H_2O_2 = peróxido de hidrogênio; $\bullet OH$ = radical hidroxil; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; GR = glutatona redutase; TrxR = tiorredoxina redutase; GPx = glutatona peroxidase; GSH = glutatona; GSSG = glutatona dissulfeto; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo.

Fonte: Adaptado de Evans et al. (2002).

A catalase está localizada nos peroxissomos presentes em quase todos os órgãos, especialmente nos hepatócitos, nos eritrócitos e no rim (VALKO et al., 2006). Apresenta um grupo heme no seu sítio ativo e age principalmente em altas concentrações de peróxidos de hidrogênio, pois possui um Km elevado (AEBI, 1984).

O sistema da glutatona inclui as atividades das enzimas GPx e GR, onde a GPx promove a redução do H_2O_2 utilizando como substrato glutatona reduzida (GSH), e a glutatona oxidada formada nesta reação é reciclada pela enzima GR, que utiliza NADPH como cofator. A reciclagem de GSH pela enzima GR é uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular, por que baixas concentrações de GSH são indicativas de estresse oxidativo (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Outra enzima envolvida na remoção do H_2O_2 é a enzima TrxR-1, uma selenoflavoproteína, que em conjunto com a proteína tiorredoxina (Trx) e o NADPH, forma o sistema da tiorredoxina, responsável pela redução de proteínas sulfidrílicas (HOLMGREN; BJÖRNSTEDT, 1995). A tiorredoxina pode agir de forma direta, reduzindo hidroperóxidos (MAY; MORROW; BURK, 2002) ou de forma indireta, como substrato da enzima TrxR-1 para redução de outras proteínas (WASSMANN et al., 2004).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas existem as defesas antioxidantes não enzimáticas compostas especialmente pela GSH e o ácido ascórbico (vitamina C) (VALKO et al., 2007). O tripeptídeo GSH, é o principal regulador da homeostase redox celular graças ao

grupo –SH do seu resíduo de cisteína (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003). A GSH atua como cofator das enzimas GPx e glutathiona-S-transferase (MASELLA et al., 2005), elimina radicais livres diretamente e regenera as vitaminas C e E em suas formas ativas (VALKO et al., 2007). Outro antioxidante não enzimático é a vitamina C, encontrado em frutas e vegetais, que exerce ação protetora no organismo (MAYNE, 2003), agindo diretamente sobre as EROs e também na regeneração da vitamina E (α - tocoferol) (VILLACORTA; AZZI; ZINGG, 2007).

Situações de desequilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, contribuem para o desenvolvimento do diabetes bem como de suas complicações macrovasculares (SCHAFFER; JON; MOZAFFARI, 2012) e microvasculares (FONG et al., 2003; YAMAGISHI et al., 2012).

1.2.5 Inflamação e diabetes

O DM2 é caracterizado pelo baixo grau de inflamação sistêmica crônica, onde ocorre modesta, mas significativa infiltração de células inflamatórias na maioria dos órgãos (MANDRUP-POULSEN, 2013).

O acompanhamento de sujeitos não diabéticos com níveis elevados de marcadores inflamatórios como TNF- α , IL-1 e IL-6 revelou que estes apresentaram forte predisposição ao desenvolvimento de DM2 num período de dois anos (SPRANGER et al., 2003). Adicionalmente, a expressão de TNF- α pelas células do tecido adiposo em modelo animal de obesidade está relacionada com inflamação tecidual, resistência à insulina e diabetes (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993). Pacientes diabéticos apresentaram níveis plasmáticos elevados de IL-6, proteína C reativa (PCR) e TNF- α , sugerindo uma associação entre a inflamação de baixo grau e qualidade de controle da glicemia, devido à correlação significativa entre os níveis de marcadores inflamatórios e de hemoglobina glicada (MIRZA et al., 2012). Além disso, altos níveis de TNF- α estão relacionados a complicações decorrentes do DM2 como a neuropatia diabética, onde os níveis de TNF- α se elevam com o tempo de complicação da patologia (HUSSAIN et al., 2013).

O estresse metabólico que promove a resistência à insulina e DM2 também ativa vias sensíveis ao estresse como a indução de IKK β e JNK (OGIHARA et al., 2004). A quinase IKK β ativa a transcrição do NF- κ B que possui função crucial na mediação da resposta imune e resposta inflamatória. O NF- κ B está presente no citoplasma na forma inativa de um heterodímero p50 e p65 ligado a uma subunidade de proteína inibidora I κ B- α . Após a sua

ativação ocorre a fosforilação (KARIN; BEN-NERIAH, 2000) e subsequente degradação proteolítica da proteína inibidora I κ B pela quinases específicas I κ B (IKK) (KARIN, 1999). O NF- κ B sem a proteína I κ B- α , é translocado para o núcleo, onde regula a expressão de um grande número de genes incluindo citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-6), moléculas de adesão, proteína quimiotática de macrófagos entre outros (BARNES; KARIN, 1997). Além disso, o NF- κ B pode ser ativado por estímulos endógenos e exógenos incluindo hiperglicemia, níveis elevados de ácidos graxos livres, estresse oxidativo (EVANS, 2002), TNF- α , IL-1 β , infecção viral e radiação UV (BARNES; KARIN, 1997) (Figura 5).

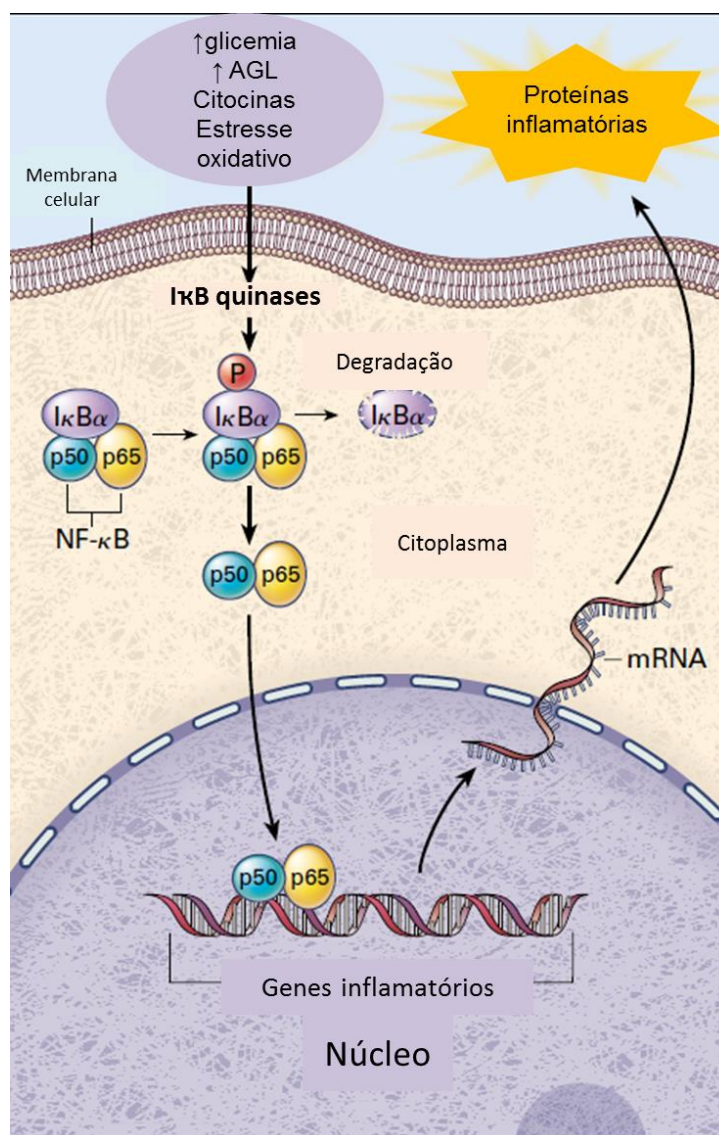


Figura 5: Representação esquemática da ativação do NF- κ B. AGL= ácidos graxos livres; I κ B- α = proteína inibidora tipo alfa; p50 e p65= heterodímeros do NF- κ B; mRNA= RNA mensageiro; I κ B quinase = enzima quinase I κ B.

Fonte: Adaptado de Barnes e Karin (1997) modificado por Evans et al. (2002).

Outra quinase ativada é JNK que ativa a transcrição de fatores ELK1, ATF2 e JUN que ativam a expressão de citocinas pro-inflamatórias, que por sua vez podem ativar JNK da mesma forma que ativam o NF- κ B (SOLINAS; KARIN, 2010). A estimulação de produção de citocinas pro-inflamatórias agrava a resistência à insulina do DM2 (BLOCH-DAMTI; BASHAN, 2005). A ativação da JNK está associada com a fosforilação de um resíduo de serina do IRS-1 modificando a ação da insulina (AGUIRRE et al., 2000), conforme demonstrado na figura 6. Adicionalmente, outros estímulos que promovem a resistência à insulina e o DM2 via JNK incluem ácidos graxos livres, estresse oxidativo e produtos finais de glicação avançada (SOLINAS; KARIN, 2010).

Além disso, no DM2 a hiperglicemia crônica pode ser glicotóxica para as células β pancreáticas, alterando a secreção de insulina e aumentando marcadores inflamatórios. A incubação de células β pancreáticas de doadores de órgãos não diabéticos com altos níveis de glicose aumentou a produção de IL-1 β mediada pela ativação do NF- κ B (MAEDLER et al., 2002).

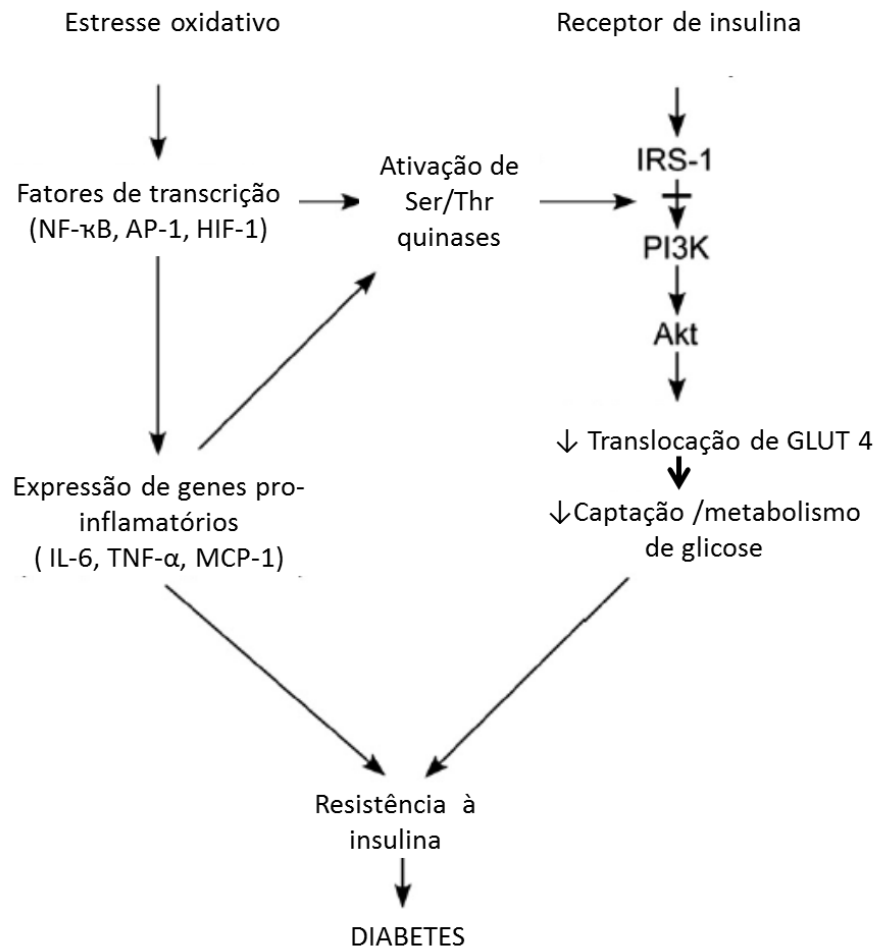


Figura 6: Esquema dos efeitos crônicos do estresse oxidativo no diabetes *mellitus* tipo 2, ativação de vias sensíveis e sinalização da insulina. NF- κ B= fator nuclear kappa B; AP-1= fator de transcrição AP-1; IL-6= interleucina 6; TNF- α = fator de necrose tumoral- alfa; MCP-1= proteína quimiotóxica para macrófago; IRS-1= substrato do receptor de insulina 1; PI3K= fosfatidilinositol 3-quinase; Akt = serina/treonina quinase.

Fonte: Adaptado de Rains e Jain (2011).

1.3 Modelos experimentais de diabetes *mellitus* tipo 2

Tendo em vista o crescente número de casos de diabetes no século XXI, modelos experimentais de DM2 em animais têm sido desenvolvidos e utilizados amplamente com a finalidade de entender as causas, as desordens metabólicas envolvidas na patologia bem como para estudos de novos fármacos para o tratamento do DM2. A streptozotocina (STZ) é uma droga utilizada para induzir o DM2 em animais, devido à ação tóxica seletiva às células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (SZKUDELSKI, 2001), a qual pode ser utilizada em baixa dose associada a dieta hipercalórica (ZHENG et al. 2011) ou em alta dose associada com nicotinamida que evita a destruição total das células β (ARYA et al., 2012).

O modelo mais utilizado que mimetiza alterações metabólicas ocorridas na enfermidade naturalmente adquirida em humanos é a indução com dieta hipercalórica e baixa dose de STZ (REUTER, 2007). Onde a primeira alteração ocorrida é uma resistência tecidual à insulina devido ao consumo de dieta rica em gordura e sacarose durante um período que variar de quinze a trinta dias (SRINIVASAN et al., 2005; WANG et al., 2007) antes da administração de STZ. A resistência à insulina desenvolvida com a dieta não altera os níveis de glicemia, mas aumenta os níveis de insulina sérica (REED et al., 2000). A alteração subsequente é a hiperglicemia induzida após administração de baixa dose de STZ (REUTER, 2007), que causa uma redução nos níveis de insulina devido à ação tóxica sobre as células β pancreáticas. As doses de STZ utilizadas para o modelo de DM2 podem variar de 30-40 mg/kg de peso corporal (SAHIN et al., 2007; WANG et al., 2007).

1.4 Terapêutica

As indicações gerais para o tratamento do DM2, segundo a atualização da Sociedade Brasileira de Diabetes (2011) é a redução da glicemia por meio de hábitos alimentares saudáveis, incluindo atividade física moderada, somados ao tratamento com hipoglicemiantes orais. Os hipoglicemiantes orais são usados quando as mudanças de hábitos alimentares não forem efetivas em atingir o melhor controle metabólico possível, como glicemia de jejum < 100 mg/dL ou pós-prandial < 140 mg/dL ou hemoglobina glicada (HbA1c) $< 7\%$. A HbA1c é amplamente utilizada para monitorização do tratamento do diabetes, pois reflete o grau de controle glicêmico dos 2 a 3 meses anteriores. A escolha da classe terapêutica está condicionada ao nível de glicemia de jejum e as manifestações clínicas. Quando a terapêutica de primeira escolha não atinge os níveis desejáveis de glicemia são necessários novos medicamentos hipoglicemiantes ou até mesmo insulina para um maior controle glicêmico (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011).

Dentre os tratamentos farmacológicos propostos para o DM2, a metformina é o tratamento inicial e de escolha para a maioria dos pacientes, devido à particularidade de não causar hipoglicemia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), seguido da classe das sulfoniluréias. A associação de classes diferentes ou administração de novas classes de fármacos (sulfoniluréias, acarbose, tiazolidinedionas e insulina) ocorrem quando não houve controle glicêmico adequado com o uso de monoterapia aliado a dieta saudável e atividade física. Aproximadamente 50% dos pacientes tratados com monoterapia precisam de tratamento adicional após 3 anos de monoterapia devido a progressão do DM, ou seja a maioria dos

pacientes necessita de múltiplas terapias para atingir os níveis desejáveis de glicemia a longo prazo (TURNER et al., 1999)

A metformina, que pertence a classe das biguanidas, promove redução da HbA1c em cerca de 1-2% (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011). O mecanismo ainda não está bem definido, mas acredita-se que a redução da glicemia é mediada pela inibição da produção de glicose hepática (JOHNSON et al., 1993; NATALI; FERRANNINI, 2006) e pela melhora na sensibilidade a insulina periférica (KIRPICHNIKOV; MCFARLANE; SOWERS, 2002). A metformina pode ser o fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes com DM2 e excesso de peso, pois está associada a redução do ganho de peso e menos ataques de hipoglicemia do que a insulina e as sulfoniluréias (UKPDS PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998a). Além disso, a terapia combinada de metformina e acarbose, inibidor da enzima α -glicosidase promovendo retardamento da digestão e absorção de carboidratos da dieta, apresentou melhora significativa no controle glicêmico e melhor resultado do que a monoterapia com acarbose em relação a diminuição do peso corporal (WANG et al., 2013).

As sulfoniluréias agem estimulando a produção endógena de insulina pelas células β do pâncreas, através da ligação ao receptor de sulfoniluréia componente do canal de potássio nas células β pancreáticas e promovem o influxo de cálcio juntamente com a liberação de insulina (AGUILAR-BRYAN et al., 1995). Apresentam ação prolongada de até 24 horas, sendo úteis no controle da glicemia de jejum e de 24 horas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011).

As tiazolidinedionas atuam melhorando a resistência à insulina através da ligação ao receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ), que regula a expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e lipídios (SPIEGELMAN, 1998). Além disso, aumentam a sensibilidade dos tecidos muscular e hepático a insulina, aumentando a utilização de glicose e diminuindo a sua produção hepática (MIYAZAKI et al., 2001). Elas melhoram a função das células β , o que se correlaciona fortemente com melhora do controle glicêmico (GASTALDELLI et al., 2006).

Apesar do valor inquestionável dos hipoglicemiantes, persiste um risco residual substancial, devido às reações adversas. Pacientes diabéticos apresentaram maior risco em desenvolver insuficiência cardíaca (7%) e edema (18%) devido ao tratamento com tiazolidinedionas, entretanto os riscos de reações hepáticas ou infarto do miocárdio desta classe se iguala a de outros hipoglicemiantes orais comumente utilizados (BERTHET et al., 2011). Além disso, o controle glicêmico obtido com o tratamento com tiazolidinedionas está associado com um aumento de 3 kg de peso corporal para cada redução de 1% na HbA1c

(YKI-JÄRVINEN, 2004). Kaul e Diamond (2008) relataram que o uso de rosiglitazona foi associado com um aumento de 43% no risco de infarto do miocárdio e de 64% no risco de morte por complicações cardiovasculares, embora o risco do uso da rosiglitazona não esteja totalmente esclarecido (KAUL; DIAMOND, 2008).

Adicionalmente hipoglicemiantes da classe das sulfoniluréias podem causar hipoglicemia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2011; UKPDS PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998b) e seu uso no tratamento do DM aumenta no risco cardiovascular, relacionado ao infarto do miocárdio, quando comparado ao hipoglicemiante metformina (JØRGENSEN et al., 2010). Confirmando estes achados, o controle glicêmico com sulfoniluréias ou insulina não reduz o risco de desenvolvimento de complicação macrovascular (UKPDS PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1998b). Adicionalmente, evidências recentes sugerem que pacientes com DM2 e com hiperinsulinemia apresentam maior risco de desenvolver câncer. Esta evidência foi confirmada por estudo de meta-análise, onde foi relatado que o tratamento com metformina apresenta risco reduzido, enquanto que o tratamento com sulfoniluréias apresenta risco maior em desenvolver esta doença (THAKKAR et al., 2013).

1.5 Jaboticaba

A planta jaboticabeira é uma árvore frutífera nativa do Brasil, originária do Centro-Sul, pertencente à família Myrtaceae, cujos frutos jaboticabas também chamadas de jaboticabas (nomenclatura internacional) apresentam características tipo baga globosa com 2,0 a 3,5 cm de diâmetro (WU; LONG; KENNELLY, 2013), quando maduras a coloração do pericarpo varia do vermelho, roxo-escuro a preto, Figura 1. A polpa é esbranquiçada mucilagínosa, de sabor agridoce e sub-ácido e apresenta de uma a quatro sementes (DONADIO, 2000). Existem duas espécies que são mais cultivadas e comercializadas no Brasil, a jaboticaba (*Mirciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) conhecida popularmente como jaboticaba Sabará, considerada uma árvore frutífera de grande porte, pois atinge de 6 a 9 metros de altura e apresenta folhas de 2-3cm de comprimento e a jaboticaba (*Mirciaria cauliflora* (Mart.) Berg.) conhecida pela população local como jaboticaba Paulista ou Açú, ao contrário da sabará é considerada uma planta de pequeno porte, árvore com altura entre 3 e 6 metros e folhas de 2-6cm de comprimento (WU; LONG; KENNELLY, 2013). Outras espécies menos comuns são: *M. coronata* (coroadá), *M. oblongata* (azedá), *M. grandifolia* (graúda), *M. aureana*

(branca), *M. phitrantha* (costada) dentre outros (DONADIO, 2000; WU; LONG; KENNELLY, 2013).

O cultivo de jabuticabeira tem despertado grande interesse entre os produtores rurais devido a sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus frutos (BRUNINI et al., 2004), as regiões mais comuns de cultivo são de clima subtropical, apesar desta se adaptar também ao clima tropical, tolerar o frio e até geadas de curta duração. Atualmente a jabuticabeira pode ser encontrada em grande parte do país, desde o Estado do Pará até o Rio Grande do Sul, mas é nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo que ocorrem maiores produções (BRUNINI et al., 2004). As jabuticabas são bastante consumidas na forma in natura e também para fabricação de vinho, suco, geléia, vinagre, aguardente e licor (DONADIO, 2000).



Figura 7: Fotografia da jabuticaba (*M. cauliflora*) (A) e fotografia da jabuticaba (*M. jaboticaba*) (B).

Fonte: Adaptado de Wu; Long; Kennelly (2013) e Coletti (2012).

Os frutos frescos apresentam ampla quantidade de nutrientes como carboidratos, sais, minerais, aminoácidos, vitaminas (WU; LONG; KENNELLY, 2013) e fibras (ALEZANDRO et al., 2013b). Além disso, as jabuticabas são ricas em antocianinas principalmente na porção da casca em ambas as espécies, mas a espécie *M. jaboticaba* apresenta maior concentração total de antocianinas (ALEZANDRO et al., 2013a).

As antocianinas pertencem a classe dos flavonoides, os quais conferem grande propriedade antioxidante (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009). Existem cinco antocianinas isoladas e quantificadas com maior frequência nas jabuticabas, bem como alguns flavonoides identificados nesta fruta, conforme demonstrado na figura 7. As diferenças entre as antocianinas estão relacionadas à estrutura quanto ao número de grupos hidroxila, a natureza e número de açúcares ligados à molécula, a natureza e o número de ácidos alifáticos ou

aromáticos ligados a moléculas de açúcar (KONG et al., 2003). As antocianinas majoritárias identificadas na casca de jabuticaba são a cianidina-3-glicosídeo e a delphinidina-3-glicosídeo (LEITE et al., 2011), as quais conferem ação antioxidante, devido a presença de grupo catecol (anel B com duas hidroxilas), grupo este capaz de doar elétron/hidrogênio para estabilizar EROs (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004).

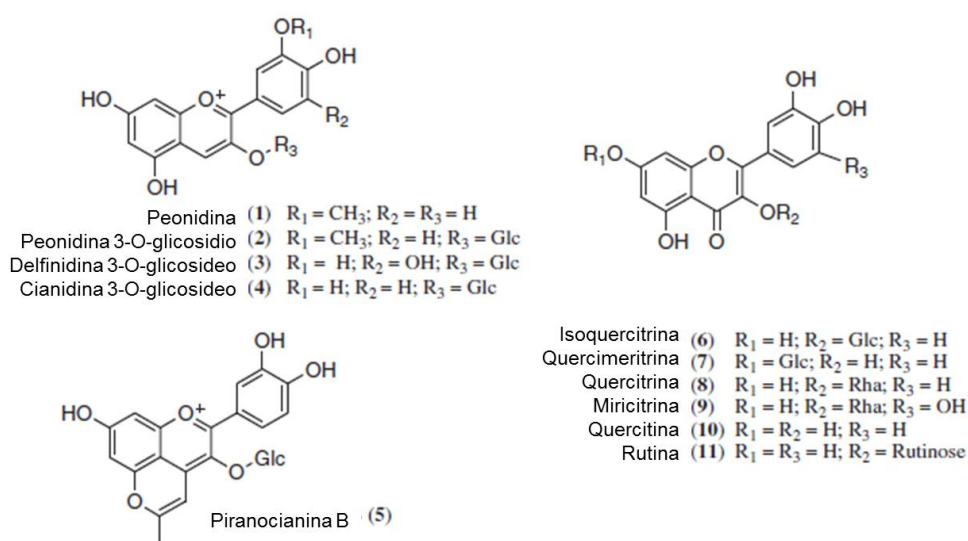


Figura 8: Antocianinas e flavonoides identificados na jabuticaba.

Glc= glicose, Rha= ramnose

Fonte: Adaptado (WU; LONG; KENNELLY, 2013).

As antocianinas além de conferir a cor característica, vermelho, roxo e azul às plantas, flores, frutos e produtos derivados também devido a ação antioxidante auxiliam em várias patologias que o estresse oxidativo está envolvido (KONG et al., 2003) como o DM2 (SANCHO; PASTORE, 2012). Além da alta concentração de antocianinas a casca da jabuticaba também apresenta quantidade considerável dos flavonoides, proantocianinas e quercetina, em concentrações mais elevadas na casca do que na polpa e sementes (ALEZANDRO et al., 2013a) e segundo estudo recente a casca da jabuticaba apresenta outros compostos fenólicos como ácido gálico e ácido elágico (BATISTA et al., 2014). Adicionalmente, a jabuticaba também é fonte de taninos como galotaninos identificados no extrato metanólico da fruta (WU et al., 2012), bem como de elagitaninos e taninos totais quantificados na fruta inteira (ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013b). A presença

de compostos fenólicos como flavonoides, taninos, ácido gálico e ácido elágico agrega maior valor a jabuticaba, pois intensificam a atividade antioxidante conferida pelas antocianinas.

Estudos recentes demonstram os efeitos benéficos da ingestão de jabuticaba (WU; LONG; KENNELLY, 2013). A suplementação com casca de jabuticaba (1 e 2% na dieta) aumentou a capacidade antioxidante no plasma de ratos saudáveis em 1,7 vezes avaliada pelo método TEAC e 1,3 vezes pelo método ORAC em ratos (LEITE et al., 2011). Adicionalmente, a suplementação com pó da casca de jabuticaba (1, 2 e 4% na dieta) durante quatro semanas reduziu os níveis de insulina e melhorou a resistência à insulina em modelo de obesidade em ratos (LENQUISTE et al., 2012). Além disso, aumentou a sensibilidade à insulina por meio da melhora da transdução do sinal da insulina em tecidos sensíveis a insulina e atenuou a inflamação, através da redução da expressão de IL-1 β e IL-6 via redução da fosforilação da proteína inibidora I κ B- α , em camundongos alimentados com uma dieta hiperlipídica (DRAGANO et al., 2013).

Um extrato polar JAB apresentou efeito antiproliferativo em cultura de células leucêmicas, enquanto um extrato mais apolar apresentou efeito antiproliferativo em cultura de células de câncer de próstata (LEITE-LEGATTI et al., 2012). Adicionalmente, o pó da fruta inteira de jabuticaba melhorou o perfil lipídico e o estresse oxidativo de ratos com diabetes tipo 1 induzida por estreptozotocina, após 40 dias de tratamento (ALEZANDRO; GRANATO; GENOVESE, 2013b)

1.5.1 Antocianinas no tratamento do diabetes

Considerando que o estresse oxidativo e a inflamação estão envolvidos na patogênese do DM, a inclusão de antioxidantes na dieta pode ser uma alternativa para minimizar as complicações do DM. Acredita-se que grande parte da atividade antioxidante de frutas e vegetais é devido à presença de flavonoides e polifenóis nos mesmos (PIETTA; ABOUT; ARTICLE, 2000). Adicionalmente, foi demonstrado que antioxidantes promovem benefícios a saúde, devido ao seu efeito protetor contra os danos causados pelo excesso de EROs em várias doenças (ROEHRS et al., 2014; XIE et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Extrato de folhas de *Vaccinium arctostaphylos*, ricos em flavonoides, melhoraram a defesa antioxidante enzimática de ratos diabéticos (FESHANI; KOUHSARI; MOHAMMADI, 2011). Da mesma forma, antocianinas da framboesa adicionadas na ração (0,1%) atenuaram a peroxidação lipídica (TBARS) em modelo animal de DM (SUGIMOTO et al., 2003). Um extrato de mirtilo rico em antocianinas reduziu a hiperglicemia e melhorou a

sensibilidade à insulina via ativação da AMP- proteína quinase (AMPK), que regula o transportador de glicose (GLUT4) nos adipócitos e no tecido muscular (TAKIKAWA et al., 2010). Os flavonoides inibem α -amilases e α -glicosidases envolvidas na digestão de carboidratos, o que retarda a absorção de glicose, suprimindo a hiperglicemia pós-prandial (HANHINEVA et al., 2010). Este efeito inibitório depende da espécie vegetal, pois as antocianinas da grosélia e do mirtilo são mais responsáveis pela inibição da α -glicosidases, enquanto a presença de taninos nos extratos de morango e framboesa promovem a inibição da α -amilase (MCDOUGALL et al., 2005).

Além disso, os flavonoides possuem propriedade anti-inflamatória podendo atuar de forma direta inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias. Essa propriedade foi demonstrada por Mahmoud et al. (2012), que observou redução nos níveis de IL-6 e TNF- α , bem como uma redução da peroxidação lipídica e aumento de GSH em modelo animal de DM2 após o tratamento com flavonoides, hesperidina ou naringina por 4 semanas. Da mesma forma, a suplementação na dieta com antocianinas do mirtilo reduziu a expressão de TNF- α , proteína quimiotática para macrófago (MCP-1) e IL-6 no tecido adiposo em modelo de obesidade em camundongos (DEFURIA et al., 2009).

Adicionalmente, os flavonoides do extrato da semente de jambolão (*Eugenia jambolana*) também apresentaram efeito hipolipidêmico em ratos diabéticos, reduzindo os níveis de colesterol total, triglicerídeos e aumentando os níveis de HDL (SHARMA; BALOMAJUMDER; ROY, 2008).

1.5.2 Absorção e biotransformação das antocianinas

Ao analisar as antocianinas como compostos antioxidantes um fator importante a ser considerado é a forma como são absorvidas no organismo. As antocianinas são rapidamente absorvidas no estômago, mas apenas entre 20% (FELGINES et al., 2006) e 25% (TALAVÉRA et al., 2003) da quantidade consumida. A absorção varia de acordo com a estrutura tanto da aglicona como da porção açúcar (WU et al., 2005). Estudos sugerem que as antocianinas podem ser absorvidas na forma glicosilada intacta (CAO et al., 2001), bem como outros estudos sugerem que são absorvidas na forma de aglicona (TALAVÉRA, SÉVERINE FELGINES et al., 2005). O pico de absorção das antocianinas do suco de groselha, delphinidina 3-rubinosídeo, delphinidina 3- glicosídeo, cianidina-3 glicosídeo e cianidina 3-rutinosídeo, ocorre aproximadamente em 30 min após a ingestão oral e após 8 horas não foram mais detectadas antocianinas intactas no plasma (MATSUMOTO et al., 2006).

Após a absorção, as antocianinas são extensivamente biotransformadas nos enterócitos e fígado, através de reações com o ácido glicurônico e metilação (TALAVÉRA, SÉVERINE FELGINES et al., 2005; WU et al., 2005). Além disso, a microflora intestinal desempenha um papel importante no metabolismo e degradação das antocianinas quando elas atingem o cólon seja quando elas não são absorvidas no estômago e intestino delgado ou por serem excretadas pela bile após a absorção (KAY, 2006). Dessa forma as antocianinas estão sujeitas a hidrólise das porções açúcares transformados em compostos mais lipofílicos que são absorvidos e a hidrólise das formas agliconas, as quais são degradadas a ácidos fenólicos e podem ser reabsorvidos (KEPPLER; HUMPF, 2005). Adicionalmente, estudos recentes demonstram que as polifenóis/ antocianinas não absorvidas no estômago e intestino delgado podem ser metabolizadas pela microflora intestinal antes de serem absorvidas, o que resulta em efeitos benéficos a saúde, pois ao ser metabolizados podem estimular o crescimento e atividade microbiana promovendo assim efeito prebiótico (ANHÊ et al., 2013; MOCO; MARTIN; REZZI, 2012). Devido essa intensa metabolização e rápida excreção (TALAVÉRA et al., 2003) vários estudos relataram a baixa biodisponibilidade das antocianinas (CRESPY et al., 2001; FELGINES et al., 2003). Um estudo em humanos observou baixa absorção de antocianinas após o consumo de suco de uva rose ou vinho tinto, entretanto o consumo de ambos apresentou ação antioxidante mesmo em baixas concentrações (BITSCH et al., 2004). Kalt et al. (2008) não encontraram antocianinas no plasma de porcos suplementados por 4 semanas com mirtilo, entretanto observaram que as mesmas podem se acumular em alguns órgãos como cérebro, fígado e olhos, exercendo efeitos benéficos.

Acredita-se que devido à baixa biodisponibilidade, a relevante ação antioxidante dos polifenóis não seja uma ação direta, mas sim uma ação indireta modulando a expressão gênica de enzimas antioxidantes como a SOD e GPx (SPANIER et al., 2009) e também modulando a sinalização celular, expressão de genes ou interação com receptores (FRAGA; OTEIZA, 2011). A ação indireta ocorre em muitos tecidos onde as concentrações de flavonoides/antocianinas estão em níveis fisiológicos muito baixos ($< \mu\text{M}$) para fornecer qualquer ação antioxidante direta relevante em comparação com outros compostos presentes em maior concentração com conhecida ação antioxidante como: glutathione, ácido ascórbico e de tocoferóis nesses tecidos (GALLEANO et al., 2010). Adicionalmente, quando em maior concentração em tecidos que são diretamente expostos aos flavonoides como o trato gastrointestinal, os flavonóis podem remover diretamente os radicais livres devido a maior concentração em torno de μM (FRAGA; OTEIZA, 2011; GALLEANO et al., 2010).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com pó da cas\ca da jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) sobre as alterações bioquímicas, o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e dano pancreático em modelo experimental de DM2 induzida por dieta hipercalórica associada a uma dose baixa de STZ em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar os efeitos da suplementação com o pó da casca de jabuticaba sobre:

- Os níveis séricos de glicose, frutossamina e insulina, além do índice de resistência à insulina, como indicadores de alterações bioquímicas nos animais.
- A atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx, TrxR-1 e CAT no sangue total, e indicadores de oxidação lipídica (níveis de LDLox) e proteica (AOPP) no soro, como indicadores de estresse oxidativo nos animais.
- Os níveis séricos de IL-6, IL-1 e TNF- α , como marcadores inflamatórios dos animais.
- O número e área das ilhotas de Langerhans, como indicador de dano pancreático.

3. RESULTADOS

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) peel improves inflammatory and oxidative stress markers in animal model of type 2 diabetes

Andréia Quatrin, Lisiane Conte, Cassieli Gehlen Figueiredo, Dariane Trivisiol da Silva, Matheus da Trindade Viegas, Sabrina Somacal, Miguel Roehrs, Etiane Tatsch, Alessandra Lencina del Castillo, Marcelo Leite da Veiga, Marta Medeiros Frescura Duarte, Rafael Noal Moresco, Alice Vieira Leite-Legatti, Ângela Giovana Batista, Mário Roberto Maróstica Júnior, Tatiana Emanuelli

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Functional Foods*

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) peel improves inflammatory and oxidative stress markers in animal model of type 2 diabetes

Andréia Quatrin^{1,2}, Lisiane Conte², Cassieli Gehlen Figueiredo², Dariane Trivisiol da Silva²,
Matheus da Trindade Viegas², Sabrina Somacal^{1,2}, Miguel Roehrs^{1,2}, Etiane Tatsch⁵,
Alessandra Lencina del Castillo³, Marcelo Leite da Veiga³, Marta Medeiros Frescura Duarte⁴,
Rafael Noal Moresco⁵, Alice Vieira Leite-Legatti⁶, Ângela Giovana Batista⁶, Mário Roberto
Maróstica Júnior⁶, Tatiana Emanuelli^{1,2}.

¹Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

²Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

³Department of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, 97020-001, Santa Maria, RS, Brazil;

⁵Department of Clinical and Toxicological Analysis, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

⁶School of Food Engineering, University of Campinas - UNICAMP, 13083-862 Campinas, SP, Brazil

*Corresponding author Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353. E-mail address:

tatiemanuelli@gmail.com (Tatiana Emanuelli).

Abstract

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) is a black-colored fruit crop from Brazil, which has a polyphenol-rich peel. This study aimed at evaluating the effects of jaboticaba peel powder (JAB) on oxidative stress, biochemical and inflammatory markers, as well as pancreatic damage in a type 2 diabetes (DM2) rat model induced by high-fat diet combined with low dose of streptozotocin. Diabetic rats received vehicle or JAB (equivalent to 0.07-0.28 g anthocyanins/L of drinking water) during 8 weeks. JAB treatment reduced the end glycemia, insulin resistance and the pancreatic damage. These protective effects appear to be underlined by antioxidant and anti-inflammatory mechanisms, since JAB also reduced the oxidative stress due an improvement of antioxidant enzyme activities and reduced the pro-inflammatory cytokines levels of diabetic rats.

Keywords: Diabetes, Insulin resistance, Oxidative stress, Anthocyanins, Inflammatory response

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease, which is characterized by hyperglycemia due to defects in both insulin secretion and insulin sensitivity (Chen et al., 2013). The DM has been recognized as a growing public health problem, which affected 382 million adults (8.5% of total population) around the world in 2013 (International Diabetes Federation, 2013). Type 2 diabetes (DM2) is a multifactorial disease, which is triggered by environmental factors such as high-fat diet (van Dam, Rimm, Willett, Stampfer, & Hu, 2002) and physical inactivity, as well as aging and genetic predisposition (International Diabetes Federation, 2013; Saltiel, 2001). DM2 is characterized by variable degrees of tissue insulin resistance (Kahn, Hull, & Utzschneider, 2006; Tang, Li, Liu, Huang, & Ho, 2013), that is strongly associated with obesity.

Obesity is characterized by a state of chronic low-grade inflammation (Wellen & Hotamisligil, 2005), and is related with the development of insulin resistance (Bhandari et al., 2013), due to the exposure of cells to tumor necrosis factor- α (TNF- α), or elevated levels of free fatty acids, which stimulate the sensitization of insulin receptors (Kahn, Hull, & Utzschneider, 2006).

The oxidative stress is a widely accepted actor in the development and progression of diabetes and its complications (Madonna & De Caterina, 2011). Hyperglycemia increases the generation of reactive oxygen species (ROS), which induces oxidative stress characterized by lipid and protein oxidation, as well as impairment in the antioxidant defense system (Ramakrishna & Jaiikhani, 2008) in a variety of tissues (Alejandro, Granato, & Genovese, 2013). Additionally, the hyperglycemia and the oxidative stress can activate the nuclear factor- κ B (NF- κ B), which increases the expression of pro-inflammatory cytokines (Evans, Goldfine, Maddux, & Grodsky, 2002), such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 (IL-1) and TNF- α in DM2 model (Arya et al., 2012).

Nutritional strategies to attenuate or prevent the development of the DM would be welcome because most drugs used in the DM therapy have side-effects (Berthet, Olivier, Montastruc, & Lapeyre-Mestre, 2011). As recently reviewed (Sancho & Pastore, 2012), anthocyanins and other phenolic compounds have beneficial effects in DM2, by decreasing the hyperglycemia and increasing insulin sensitivity (Takikawa, Inoue, Horio, & Tsuda, 2010; Tang et al., 2013) and β -cell functionality, besides reducing the accumulation of body fat (Prior et al., 2010). These compounds also showed anti-inflammatory action in a DM model (Prangthip et al., 2013). In fact, the consumption some polyphenol-rich fruits (blueberries, grapes and apples) was associated with a reduced risk of DM2 (Muraki, Imamura, & Manson, 2013).

Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) is a dark-colored South American native fruit which belongs to the *Myrtaceae* family and has been demonstrated potential health benefits (Wu, Long, & Kennelly, 2013). Jaboticaba peel is a rich source of polyphenols that is usually consumed with the fruit flesh. It increased the antioxidant capacity of healthy and obese rats (Batista et al., 2014; Leite et al., 2011) and improved insulin resistance in murine models of obesity (Dragano et al., 2013; Lenquiste, Batista, Marineli, Dragano, & Maróstica, 2012). However, the beneficial role of jaboticaba peel in diabetes has been explored by a single study, which evaluated the oxidative stress in a rat model of streptozotocin (STZ)-induced diabetes (Alezandro et al., 2013).

The STZ alone is unsuitable to mimic DM2, which is the most common type of DM, because insulin insufficiency is the main cause of hyperglycemia in the STZ-model, instead of insulin resistance (Tang et al., 2013). Therefore, the objective of this investigation was to clarify the effects of jaboticaba peel in an animal model of DM2 induced by combining STZ and high-fat diet. This model was chosen because its development is similar to the progression of human DM2, where the first event is the insulin resistance with the intake of high-fat diet and lastly the hyperglycemia is induced by STZ injection, which is associated with a mild impairment in the insulin secretion by the pancreatic β -cells (Reuter, 2007).

This investigation aimed to evaluate the effects of supplementation with the jaboticaba peel powder (JAB) on oxidative stress, pancreatic damage, biochemical and inflammatory markers using a rat model of DM2.

2. Materials and methods

2.1 Samples

Jaboticaba fruits (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg.) were collected in Campinas (São Paulo, Brazil), washed and manually peeled. The peels were frozen at -18°C and then freeze-

dried in a Liobras (São Carlos, São Paulo, Brazil) freeze-dryer. The JAB was stored at -80°C . The composition of polyphenols was analyzed by HPLC with photodiode array detector. The JAB contained 2.59 g anthocyanins/100 g, being cyanidin-3 glycoside the dominant anthocyanin (75.5% of total anthocyanins) (Leite et al., 2011), and other phenolic compounds (0.3 g ellagic acid/100 g, 0.05 g quercetin/100 g and 0.04 g gallic acid/100 g) (Batista et al., 2014).

2.2 Animals and experimental induction of diabetes

Forty male Wistar rats (eight-weeks old, 150-200g) were supplied by the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM, RS, Brazil). All the adopted procedures were approved by Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources/UFSM (protocol no.: 086/2013). The animals were housed in standard polypropylene cages (four rats/cage) and maintained under controlled room temperature ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity ($55 \pm 5\%$) with 12:12 h light and dark cycle with access to food and water *ad libitum*.

After an one-week acclimation period, the rats were randomly divided in two dietary regimens, receiving 30 g diet/day/rat and water *ad libitum* (Figure 1). The non-diabetic control group received a commercial chow diet (Nuvilab CR 1, Quimtia, Colombo, Paraná, Brazil), whereas the diabetic animals received a high-fat diet (HFD), containing 74% commercial chow (Nuvilab CR 1, Quimtia, Colombo, Paraná, Brazil), 16% lard and 10% sucrose (w/w). Table 1 displays the energy and chemical composition of both diets. The HFD had higher fat and soluble carbohydrates content but lower protein and dietary fiber content than the commercial chow because of the dilution effect caused by the addition of lard and sucrose to the commercial chow. After 30 days of dietary manipulation, animals were overnight fasted and the control group was injected with 0.1 M citrate buffer (pH 4.4) (1

mL/kg b.w., i.p.), whereas the HFD-fed rats received a freshly prepared solution of streptozotocin (STZ) (35 mg/kg, 1 mL/kg b.w., i.p.) to induce DM2 (Srinivasan, Viswanad, Asrat, Kaul, & Ramarao, 2005). Seven days after STZ administration, glycemia was measured and only the STZ-injected rats that had blood glucose levels higher than 250 mg/dL were assigned to the diabetic groups.

To evaluate the effect of JAB, the diabetic rats were divided into 4 treatment groups (8 animals/group) that received vehicle (water containing 0.5% carboxymethyl cellulose) or JAB (dissolved in water containing 0.5% carboxymethyl cellulose) as the drinking water and compared to a non-diabetic control group (8 animals) that received vehicle in the drinking water. Carboxymethyl cellulose was used to stabilize the JAB aqueous suspension. The treatment lasted 8 weeks and during this period rats received drinking solutions *ad libitum*, control rats continued to receive the commercial chow (30 g/day/rat), whereas the diabetic rats continued to receive the HFD (30 g/day/rat), as follows:

Non diabetic control group– non-diabetic rats that were fed commercial chow and received vehicle as the drinking water;

Diabetic-vehicle group– diabetic rats that were fed HFD and received vehicle as the drinking water;

JAB-I group– diabetic rats that were fed HFD and received JAB (2.7 g/L that is equivalent to 0.07 g anthocyanins/L) as the drinking water;

JAB-II group– diabetic rats that were fed HFD and received JAB (5.4 g/L that is equivalent to 0.14 g anthocyanins/L) as the drinking water;

JAB-III group– diabetic rats that were fed HFD and received JAB (10.8 g/L that is equivalent to 0.28 g anthocyanins/L) as the drinking water.

Food and water intake was recorded daily. Body weight was measured every 3 days. At the end of the experiment, rats were fasted for 8 h and then blood was collected from the

caudal vein and glucose levels were determined with an automatic analyzer donated by Roche® of Brazil (Advantage, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana, USA). Subsequently, rats were anesthetized with isofluorane and the blood was collected by cardiac puncture into heparinized tubes to obtain whole blood and into tubes with no additives to obtain serum after centrifugation at $2000 \times g$ for 15 min. The serum and blood were stored at -20°C until biochemical analyses. The pancreas was quickly removed for histopathological analysis.

2.3 Composition of diets

Moisture, ash, total dietary fiber and crude protein were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1995). Total lipids were extracted using chloroform and methanol and quantified by gravimetry (Bligh & Dyer, 1959). Non-fibrous carbohydrates were calculated by difference, soluble sugars were extracted using ethyl alcohol and determined by the phenol-sulfuric acid assay (Hall, 2000). Starch was calculated as the difference between non-fibrous carbohydrates and soluble sugars.

2.4 Biochemical assays

Fructosamine was measured using a kinetic assay kit (Gold Analisa, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Insulin was measured by radioimmunoassay using commercial Immunotech (Beckman Coulter Company, Marseille/France). The homeostasis model assessment estimate of insulin resistance (HOMA-IR), a marker of insulin resistance, was evaluated according to Matthews, Hosker, Rudenski, and Naylor (1985) as follows:

$$[\text{fasting insulin } (\mu\text{U/mL}) \times \text{fasting glucose (mmol/L)}] / 22.5$$

2.5 Markers of oxidative stress

Oxidized LDL (LDLox) was determined by a capture ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Merckodia AB, Uppsala, Sweden). Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined at 340 nm after solubilization of lipids with citric acid (Hanasand et al., 2012).

2.6 Antioxidants enzymes

Thioredoxin reductase-1 (TrxR-1) activity was determined at 412 nm using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as the substrate (Holmgren & Björnstedt, 1995). Superoxide dismutase (SOD) activity was determined based on its ability to inhibit the autoxidation of epinephrine to adrenochrome at an alkaline pH at 480 nm (Misra & Fridovich, 1972). Catalase (CAT) enzyme activity was measured at 240 nm by monitoring the initial rate of disappearance of hydrogen peroxide (Aebi, 1984). Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using purified reduced glutathione, GR and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm (Paglia & Valentine, 1967).

2.7 Inflammatory markers

Serum interleukins 1 and 6 (IL-1, IL-6) and TNF- α were measured by ELISA (eBIOSCIENCE®, San Diego, CA, USA).

2.8 Histological analysis

The pancreatic segment was fixed with 10% formalin and embedded in paraffin. Sections of 7 μ m were obtained with a standard microtome and were stained with hematoxylin and eosin for microscopic assessment. The sections were examined and graded by a pathologist without knowledge of the experimental groups. The area and the number of

pancreatic islets were quantified under microscope (measurement of five vision fields) according to Zhang et al. (2010).

3. Statistical analyses

Data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by *post hoc* Duncan's multiple range test when necessary. Data that did not meet the ANOVA assumptions were submitted to the non-parametric Kruskal Wallis analysis, followed by a multiple comparison test. The associations between variables were evaluated by Spearman's rank order correlation. Results were expressed as the mean \pm SEM and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Data were analyzed using the Statistica $\text{\textcircled{R}}$ 9.1 software system (Statsoft Inc., 2004).

4. Results

The food intake data showed no differences among the groups ($p > 0.05$) but all diabetic groups had higher liquid and energy intake than the control group (Table 2, $p < 0.05$). The supplementation of diabetic rats with JAB through the drinking water did not influence food, liquid or energy intake (Table 2, $p > 0.05$). The intake of anthocyanins linearly increased with the increase of JAB in the drinking water (Table 2, $p < 0.05$).

Although the weight gain of the diabetic-vehicle group did not differ from the control group (Figure 2A; $p > 0.05$), the diabetic-vehicle group had greater epididymal fat than the control group (Figure 2B; $p < 0.05$). JAB supplementation (JAB-I and JAB-II) decreased the weight gain of diabetic rats when compared to the control group and JAB-II treatment decreased the weight gain compared to the diabetic group, whereas only JAB-I treatment completely prevented the increase in the epididymal fat of diabetic rats (Figure 2, $p < 0.05$).

The DM2 induction increased the blood glucose levels by three times in comparison to the control group (onset blood glucose levels; Figure 3A; $p < 0.05$). After 8 weeks of treatment, blood glucose levels increased 37% in the diabetic-vehicle group (onset vs. end glucose; Figure 3A; $p < 0.05$). This increase was prevented in the diabetic rats supplemented with JAB (Figure 3A; $p < 0.05$). JAB-III supplementation also prevented the increase in blood fructosamine levels that occurred in the diabetic vehicle group compared to the control group (Figure 3B; $p < 0.05$).

The induction of diabetes did not alter fasting serum insulin levels. However, the diabetic JAB-I group had lower insulin level than the diabetic-vehicle group (Figure 3C; $p < 0.05$). The DM2 model was responsible for the increased HOMA-IR levels as related to the control group ($p < 0.05$). Nevertheless, this increase was prevented in the JAB-I and JAB-III diabetic groups (Figure 3D; $p < 0.05$).

The AOPP and LDLox levels were higher in the diabetic-vehicle group than in the control group (Figure 4; $p < 0.05$). These results were partially attenuated in the diabetic JAB-II group, and the increase in the LDLox levels was completely prevented in the diabetic JAB-III group (Figure 4, $p < 0.05$).

The DM2 model induced a reduction in the activities of antioxidant enzymes, such as SOD, GPx, CAT and TrxR-1, when compared to the control group (Figure 5; $p < 0.05$). The JAB supplementation did not prevent the decrease of the SOD activity (Figure 5A, $p > 0.05$), but all JAB doses were responsible for the higher GPx, TrxR-1 and CAT activities (Figures 5B, 5D and 5C; $p < 0.05$).

The levels of inflammatory markers (IL-1, IL-6 and TNF- α) were significantly increased in the DM2 in comparison to the control group (Figure 6; $p < 0.05$). JAB, at the highest dose, showed anti-inflammatory action by attenuating the changes in IL-1, IL-6 and TNF- α levels in the diabetic rats (Figure 6; $p < 0.05$).

DM2 caused a histological damage in the pancreas, characterized by a decrease in the number and area of islets when compared to the control group (Figure 7, $p < 0.05$). JAB treatment did not change the number of pancreatic islets of diabetic rats but JAB-I and JAB-III treatment prevented the decrease in the islets area of diabetic rats (Figure 7; $p < 0.05$).

End glucose, HOMA-IR and LDLox were positively correlated to inflammatory markers (IL-1, IL-6 and TNF- α) and negatively correlated with the average area of the islet (Table 3; $p < 0.05$). The end glucose levels were also positively correlated to AOPP and LDLox levels (Table 3; $p < 0.05$). In contrast, HOMA-IR had no significant correlation with AOPP levels (Table 3; $p > 0.05$), but had a positive correlation with LDLox levels (Table 3; $p < 0.05$).

5. Discussion

Hyperglycemia and insulin resistance were observed in the diabetic rats, which, according to the literature indicate that the metabolic characteristics of the human syndrome was replicated (International Diabetes Federation, 2013). Thus, we found pancreatic damage characterized by a decrease in the number and area of pancreatic islets in diabetic rats but no change in their fasting insulin levels. This finding is explained because there is only a relative insulin deficiency due to the decline in the secretory capacity of pancreatic β -cells. JAB, at the lowest and highest doses, attenuated the pancreatic damage in diabetic rats.

The supplementation with the lowest and the highest doses of JAB attenuated the insulin resistance (HOMA-IR) of diabetic rats. At the lowest dose, this effect was due to a decrease in fasting insulin levels, but no change in the glycemia was observed, whereas at the highest dose the effect was due to a decrease in glycemia, followed by no change in fasting insulin levels. It is noteworthy that the 8-week supplementation at the highest dose of JAB completely prevented the increases in the hyperglycemia over time (onset vs. end levels) and fructosamine levels, which is important for delaying diabetes complications (Madonna & De

Caterina, 2011). This anti-hyperglycemic effect of JAB seems to have occurred as early as in the mid of the treatment because the decreased fructosamine levels indicates that protein glycation was reduced in the last three weeks (Ohkawara et al., 2002). JAB effects on insulin resistance and glycemia are most likely to be due to the improvement of insulin signal transduction in insulin-sensitive tissue by mechanisms related to the insulin receptor/insulin receptor substrate-1/Akt/forkhead box protein pathway as reported in a mice model of obesity (Dragano et al., 2013).

DM2 is a chronic metabolic disorder which is associated to high-fat diet intake and obesity (van Dam et al., 2002). Although, diabetic and control rats had similar body weight gains, the diabetic rats had higher epididymal fat, which is an important marker of obesity (Bhandari et al., 2013). The supplementation with JAB at the lowest and intermediate doses decreased the body weight gain of diabetic rats, whereas the lowest dose also decreased the epididymal fat of diabetic rats. This effect of JAB may be related to its inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase activities, most likely related to the presence of ellagitannins (Wu et al., 2013). However, previous studies in murine models of obesity found no change in body weight gain or epididymal fat after supplementation with 10-86 mg JAB anthocyanin/day/kg rat (Dragano et al., 2013; Lenquist et al., 2012). Thus, we can speculate that this effect is specific for diabetic models.

The hyperglycemia causes oxidative stress in the diabetes by increasing ROS generation, decreasing antioxidant levels or both (Rains & Jain, 2011). Accordingly, we observed increased LDL and protein (AOPP levels) oxidation, along with decreased activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx and TrxR-1) in the diabetic rats. Moreover, end glycemia was positively correlated with LDLox and AOPP.

JAB supplementation reduced the oxidative stress of diabetic rats by decreasing protein and LDL oxidation. This effect may be relevant for the treatment of DM2, because

LDL oxidation is an important factor in the development of macrovascular complications, mainly atherosclerosis, in human DM2 (Lamharzi et al., 2004). Although various anthocyanin-rich extracts prevent LDL oxidation *in vitro* (Heinonen, Meyer, & Frankel, 1998), few studies demonstrated that this trend effect also occurs *in vivo* (Basu et al., 2009). In fact, recent studies demonstrated that the physiological concentrations of flavonoids *in vivo* are lower than those required to directly scavenge reactive species (Galleano, Verstraeten, Oteiza, & Fraga, 2010). Thus, the antioxidant effect of JAB may be mediated by its protective effect against the DM2-induced decrease in the activities of CAT, GPx and TrxR-1. This effect is most likely related to an increase in the expression of antioxidant enzymes subsequently reducing oxidative damage. In accordance, previous studies showed that JAB supplementation improved plasma antioxidant enzymes activities and reduced tissue lipid peroxidation in a rat model of obesity (Batista et al., 2014). In addition, JAB treatment reduced lipid peroxidation and increased GPx activity in the plasma, but decreased CAT activity in a rat model of DM1 (Alejandro et al., 2013).

These antioxidant effects of JAB may be related to cyanidin-3 glucoside, which is the major anthocyanin found in the JAB. Jaboticaba has proven to contain other phenolic compounds, like gallic acid, ellagic acid and quercetin, which may also be responsible for the benefits found (Batista et al., 2014). Accordingly, other polyphenol-rich foods were shown to improve the enzymatic defenses in animal models of DM2 (Prangthip et al., 2013), as well as the treatment with purified cyanidin-3 glucoside improved lipid peroxidation in the aortic tissue of DM1 model (Nasri, Roghani, Baluchnejadmojarad, Rabani, & Balvardi, 2011).

JAB supplementation partially prevented the decrease in the area of pancreatic islets of DM2 rats. Possibly, this effect may be related to the antioxidant action of JAB, because oxidative stress was suggested to be responsible for the β -cell dysfunction in diabetes (Poitout & Robertson, 2008; Rains & Jain, 2011). Accordingly, in this study there was a negative

correlation between the LDL oxidation and the area of pancreatic islets. These results are in line with previous studies where the antioxidant activity of flavonoids prevented pancreatic histological damage in animal models of DM2 (Chen et al., 2013; Zhang et al., 2010). A strong inverse relationship was also found between the area of pancreatic islets and the HOMA-IR. In addition, the JAB doses required to reduce pancreatic damage and insulin resistance were similar, suggesting that the improvement of insulin signaling in sensitive tissues is key to prevent pancreatic damage.

The levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6 and TNF- α) were increased in diabetic rats and IL-1, IL-6 and TNF- α levels were positively correlated with the oxidation of LDL and insulin resistance. These findings are in agreement with the activation of cytokines expression by oxidative stress (Evans et al., 2002) and with the impairment of insulin action due to the increase of cytokines and oxidative stress in diabetes (Rains & Jain, 2011). The treatment with JAB at the highest dose decreased the circulating levels of pro-inflammatory cytokines. This anti-inflammatory effect may be responsible for the decreased insulin resistance and glycemia of JAB-III-treated rats. Pro-inflammatory cytokines may damage insulin signaling because they activate serine kinases that phosphorylates the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and consequently impairs the insulin-stimulated glucose uptake by tissues. Interestingly, JAB also decreased the expression of pro-inflammatory cytokines and the levels of phosphorylated I κ B- α in a mice model of obesity (Dragano et al., 2013).

6. Conclusion

The peel of jaboticaba, which is rich in polyphenols, attenuated the hyperglycemia, insulin resistance, pancreatic damage, as well as the oxidative stress and the inflammatory response in a rat model of DM2 (Figure 8). An anti-inflammatory mechanism and the improvement of enzymatic antioxidant defenses appear to be involved in the protective effect

of JAB in DM2. Thus, the consumption of this product can be further investigated as a potential preventive or therapeutic approach to treat DM2 and its complications.

Acknowledgments

This work was supported by fellowships from National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), financial support from CNPq 552440/2011-6, and Edital Capes 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional. Authors thank Doles, Brazil, for the kind donation of biochemical kits and Roche (Brazil) for the kind donation of test strips.

7. References

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, *105*, 121–126.
- Alezandro, M. R., Granato, D., & Genovese, M. I. (2013). Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. *Food Research International*, *54*(1), 650–659.
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis (18th ed.)* Washington: Association of Official Analytical Chemists. (V. Arlington, Ed.) (16th ed.).
- Arya, A., Chuen, S., Yeng, C., Taha, H., Rais, M., & Ali, M. (2012). The methanolic fraction of *Centratherrum anthelminticum* seed downregulates pro-inflammatory cytokines, oxidative stress, and hyperglycemia in STZ-nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(11), 4209–4220.
- Basu, A., Wilkinson, M., Penugonda, K., Simmons, B., Betts, N. M., & Lyons, T. J. (2009). Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal*, *8*(43), 1–7.
- Batista, A. G., Lenquiste, S. A., Cazarin, C. B. B., da Silva, J. K., Luiz-Ferreira, A., Bogusz Jr, S., ... Maróstica Jr, M. R. (2014). Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Functional Foods*, *6*, 450–461.
- Berthet, S., Olivier, P., Montastruc, J.-L., & Lapeyre-Mestre, M. (2011). Drug safety of rosiglitazone and pioglitazone in France: a study using the French Pharmacovigilance database. *BMC Clinical Pharmacology*, *11*(5), 1–6.
- Bhandari, U., Chaudhari, H. S., Bisnoi, A. N., Kumar, V., Khanna, G., & Javed, K. (2013). Anti-obesity effect of standardized ethanol extract of *Embelia ribes* in murine model of high fat diet-induced obesity. *PharmaNutrition*, *1*(2), 50–57.

- Bligh, E. G., & Dier, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, *37*, 911–917.
- Chen, F., Xiong, H., Wang, J., Ding, X., Shu, G., & Mei, Z. (2013). Antidiabetic effect of total flavonoids from *Sanguis draxonis* in type 2 diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *149*(3), 729–36.
- De Luca, C., & Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and Insulin Resistance. *FEBS Letters*, *582*(1), 97–105.
- Dragano, N. R. V, Marques, A. Y. C., Cintra, D. E. C., Solon, C., Morari, J., Leite-Legatti, A. V, ... Maróstica-Júnior, M. R. (2013). Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. *The British Journal of Nutrition*, *110*(3), 447–455.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2002). Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, *23*(5), 599–622.
- Forst, T., Hanefeld, M., Jacob, S., Moeser, G., Schwenk, G., Pfützner, A., & Haupt, A. (2013). Association of sulphonylurea treatment with all-cause and cardiovascular mortality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Diabetes & Vascular Disease Research : Official Journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease*, *10*(4), 302–14.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V, Oteiza, P. I., & Fraga, C. G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *501*(1), 23–30.
- Hall, M. B. (2000). *Neutral detergent-soluble carbohydrates Nutritional relevance and Analysis. A laboratory Manual. Bolletín 339. University of Florida Extension Institute of Food and Agricultural Sciences.*
- Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta*, *413*, 901–906.
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(10), 4107–4112.
- Holmgren, A., & Björnstedt, M. (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, *252*, 199–208.
- International Diabetes Federation. (2013). DIABETES ATLAS Sixth edition. www.idf.org/diabetesatlas.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, *444*(7121), 840–846.

- Lamharzi, N., Renard, C. B., Kramer, F., Pennathur, S., Heinecke, J. W., Chait, A., & Bornfeldt, K. E. (2004). Hyperlipidemia in Concert With Hyperglycemia Stimulates the Proliferation of Macrophages in Atherosclerotic Lesions: Potential Role of Glucose-Oxidized LDL. *Diabetes*, *53*(12), 3217–3225.
- Leite, A. V, Malta, L. G., Riccio, M. F., Eberlin, M. N., Pastore, G. M., & Maróstica Júnior, M. R. (2011). Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(6), 2277–83.
- Lenquiste, S. A., Batista, Â. G., Marineli, R. D. S., Dragano, N. R. V., & Maróstica, M. R. (2012). Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. *Food Research International*, *49*(1), 153–160.
- Madonna, R., & De Caterina, R. (2011). Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. *Vascular Pharmacology*, *54*(3-6), 68–74.
- Matthews, D., Hosker, J., Rudenski, A., Naylor, B., TREACHER, D. F., & TURNER, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, *28*, 412–419.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, *247*, 3170–3175.
- Muraki, I., Imamura, F., & Manson, J. E. (2013). Fruit consumption and risk of type 2 diabetes : results. *British Medical Journal*, *347*(f5001), 1–15.
- Nasri, S., Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T., Rabani, T., & Balvardi, M. (2011). Vascular mechanisms of cyanidin-3-glucoside response in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*, *18*(4), 273–278.
- Ohkawara, E., Nohara, Y., Kanno, Y., Suzuki, H., Matsumoto, G., Kinoshita, T., & Watanabe, M. (2002). Fructosamine assay using albumin extracted from serum. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *25*(9), 1121–4.
- Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, *70*, 158–169.
- Poitout, V., & Robertson, R. P. (2008). Glucolipotoxicity : Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocrine Reviews*, *29*(3), 351–366.
- Prangthip, P., Surasiang, R., Charoensiri, R., Leardkamolkarn, V., Komindr, S., Yamborisut, U., ... Kongkachuichai, R. (2013). Amelioration of hyperglycemia, hyperlipidemia, oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats fed a high fat diet by riceberry supplement. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 195–203.

- Prior, R. L., E Wilkes, S., R Rogers, T., Khanal, R. C., Wu, X., & Howard, L. R. (2010). Purified blueberry anthocyanins and blueberry juice alter development of obesity in mice fed an obesogenic high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3970–6.
- Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(5), 567–75.
- Ramakrishna, V., & Jaikhani, R. (2008). Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetologica*, 45, 41–46.
- Reuter, T. Y. (2007). Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 4(1), 3–8.
- Saltiel, a R. (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*, 104(4), 517–529.
- Sancho, R. a. S., & Pastore, G. M. (2012). Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 46(1), 378–386.
- Srinivasan, K., Viswanad, B., Asrat, L., Kaul, C. L., & Ramarao, P. (2005). Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 52(4), 313–20.
- Takikawa, M., Inoue, S., Horio, F., & Tsuda, T. (2010). Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. *The Journal of Nutrition*, 140(3), 527–533.
- Tang, W., Li, S., Liu, Y., Huang, M.-T., & Ho, C.-T. (2013). Anti-diabetic activity of chemically profiled green tea and black tea extracts in a type 2 diabetes mice model via different mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1784–1793.
- Van Dam, R. M., Rimm, E. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J., & Hu, F. B. (2002). Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Annals of Internal Medicine*, 136(3), 201–209.
- Wellen, K. E., & Hotamisligil, G. S. (2005). Inflammation , stress , and diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1111–1119.
- Wu, S.-B., Long, C., & Kennelly, E. J. (2013). Phytochemistry and health benefits of jaborcaba, an emerging fruit crop from Brazil. *Food Research International*, 54(1), 148–159.
- Zhang, L., Yang, J., Chen, X., Zan, K., Wen, X., Chen, H., ... Lai, M. (2010). Antidiabetic and antioxidant effects of extracts from *Potentilla discolor* Bunge on diabetic rats induced by high fat diet and streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(2), 518–524.

Table 1: Energy and chemical composition of the diets.

	Commercial chow (g %)	High-fat diet (g %)
Energy (Kcal %)	267.5 ± 0.6	369.5 ± 2.6
Moisture (%)	11.9 ± 0.1	11.3 ± 0.3
Protein (%)	22.5 ± 0.2	15.0 ± 0.2
Ash (%)	7.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Fat (%)	6.1 ± 0.2	19.2 ± 0.5
Total dietary fiber (%)	21.7 ± 0.5	15.3 ± 0.3
Non-fibrous carbohydrates (%)	30.6 ± 0.3	33.9 ± 0.3
Soluble sugar (%)	5.0 ± 0.4	15.4 ± 0.4
Starch (%)	25.6 ± 0.1	18.5 ± 0.7

Data are presented as means ± SEM.

Table 2: Food, energy, liquid and anthocyanin intake of rats during the 8-week experimental period.

	Food intake (g/day/ kg rat)	Liquid intake (ml/day/kg rat)	Anthocyanin intake (mg/day/kg rat)	Energy intake (Kcal/day/kg rat)
Control	58.8 ± 2.2 ^a	133.0 ± 9.1 ^b	-	157.4 ± 5.9 ^b
Diabetic-vehicle	68.3 ± 4.7 ^a	269.3 ± 36.8 ^a	-	252.5 ± 17.3 ^a
Diabetic JAB-I	69.9 ± 1.0 ^a	270.9 ± 17.8 ^a	19.0 ± 0.6 ^a	258.5 ± 3.8 ^a
Diabetic JAB-II	66.6 ± 3.1 ^a	272.0 ± 26.9 ^a	38.1 ± 0.3 ^b	244.6 ± 11.6 ^a
Diabetic JAB-III	65.6 ± 5.0 ^a	246.1 ± 29.7 ^a	68.9 ± 1.7 ^c	242.5 ± 18.6 ^a

Data are presented as means ± SEM (n=8). ^{abc}Means within the same column that have no common superscript letter are significantly different (p<0.05).

Table 3: Associations among diabetes (glucose and HOMA-IR), oxidative stress and inflammatory markers

Parameters	Correlation coefficients (r)		
	End glucose (mg/dL)	HOMA-IR	LDLox (mg/L)
LDLox (mg/L)	0.61*	0.56*	-
AOPP (μmol/L)	0.54*	0.14	0.55*
IL-1 (pg/mL)	0.67*	0.51*	0.86*
IL-6 (pg/mL)	0.74*	0.66*	0.89*
TNF-α (pg/mL)	0.75*	0.52*	0.80*
Average islet area (mm ² x 1000)	-0.53*	-0.76*	-0.66*

* Significantly different, p<0.05.

Figure captions

Figure 1: Experimental design. STZ = streptozotocin; JAB = jaboticaba peel powder.

Figure 2: Weight gain (A) and epididymal fat (B) of diabetic rats fed high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (means \pm SEM, n=8). *Different from the control group (p<0.05), #Different from the diabetic group (p<0.05). Onset weight groups (g): Control 184 ± 12.7 ; Vehicle 170 ± 9.1 ; JAB-I 175 ± 10.9 ; JAB-II 167 ± 7.1 ; JAB-III 168 ± 7.4 (means \pm SEM, p>0.05).

Figure 3: Onset and end glucose (A), fructosamine (B), and insulin (C) blood levels and HOMA-IR (D) of diabetic rats fed high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (means \pm SEM, n=8). & Different from the same group at the onset (Paired t-test, p < 0.05); *Different from the control group (end glucose, fructosamine and insulin ANOVA followed by Duncan's test and onset glucose and HOMA-IR Kruskal Wallis followed by multiple comparison test p<0.05); #Different from the diabetic-vehicle group (end glucose, fructosamine and insulin ANOVA followed by Duncan's test and onset glucose and HOMA-IR Kruskal-Wallis followed by multiple comparison test; p<0.05).

Figure 4: AOPP (A) and oxidized LDL (B) levels of diabetic rats fed high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (means \pm SEM, n=8). *Different from the control group (p<0.05), #Different from the diabetic-vehicle group (p<0.05). AOPP = advanced oxidation protein products

Figure 5: SOD (A), GPx (B), CAT (C), and TrxR-1(D) activities of diabetic rats fed high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (means \pm SEM, n=8). *Different from the control group (p<0.05), #Different from the diabetic-vehicle group (p<0.05). SOD = superoxide dismutase; GPx = glutathione peroxidase; CAT = catalase; TrxR-1 = thioredoxin reductase-1.

Figure 6: IL-1 (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) levels of diabetic rats fed high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (means \pm SEM n=8). *Different from the control group (p<0.05), #Different from the diabetic-vehicle group (p<0.05).

Figure 7: Representative histology of the pancreatic islet tissue of the diabetic rats fed with high-fat diet and treated with jaboticaba or vehicle for 8 weeks (amplification 200x) (A) Control group; (B) diabetic-vehicle group; (C) diabetic + JAB-I group; (D) diabetic + JAB-II group; (E) diabetic + JAB-III group; and (F) quantitative analysis of average number and area of islets (amplification 100x). Data are presented as means \pm SEM (n= 6). *Different from the control group ($p < 0.05$), #Different from the diabetic-vehicle group ($p < 0.05$). JAB = jaboticaba peel powder.


Figure 8: Proposed sites for the action of JAB in DM2. JAB sites of action are indicated by  symbol. The supplementation with JAB attenuates the hyperglycemia, insulin resistance and pancreatic damage, as well as the oxidative stress due to the increase in the activities of antioxidant enzymes. Furthermore, JAB decreases the levels of pro-inflammatory cytokines, which likely contribute to decrease the insulin resistance, because it would prevent the cytokine-induced damage to the insulin signaling. DM2 = type 2 diabetes *mellitus*; JAB = jaboticaba peel powder; ROS = reactive oxygen species.

Figure 1:

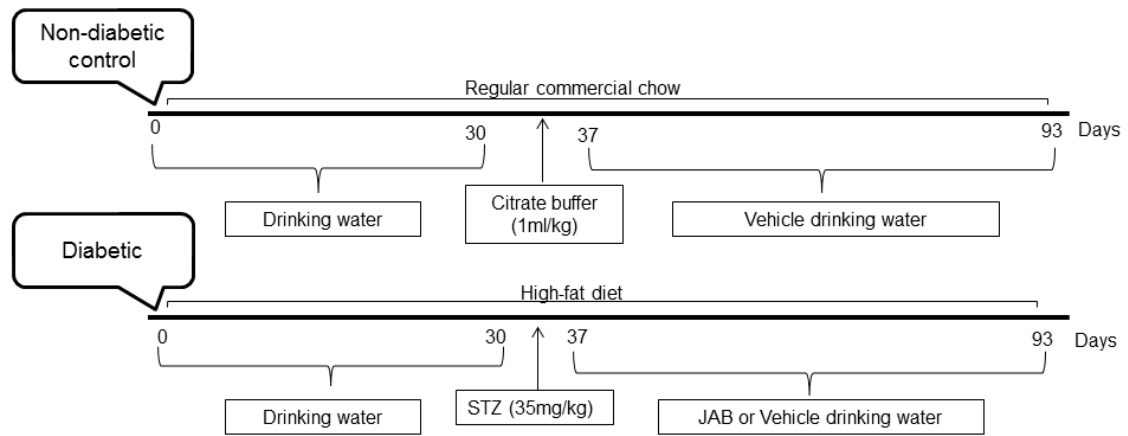


Figure 2:

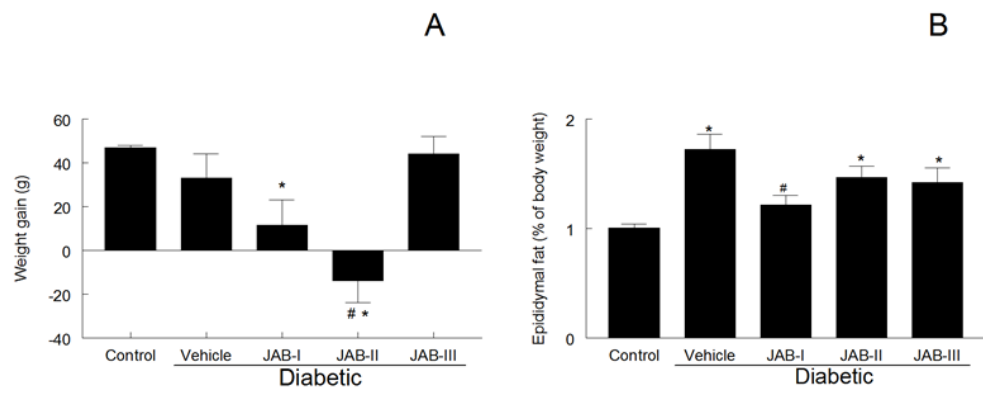


Figure 3:

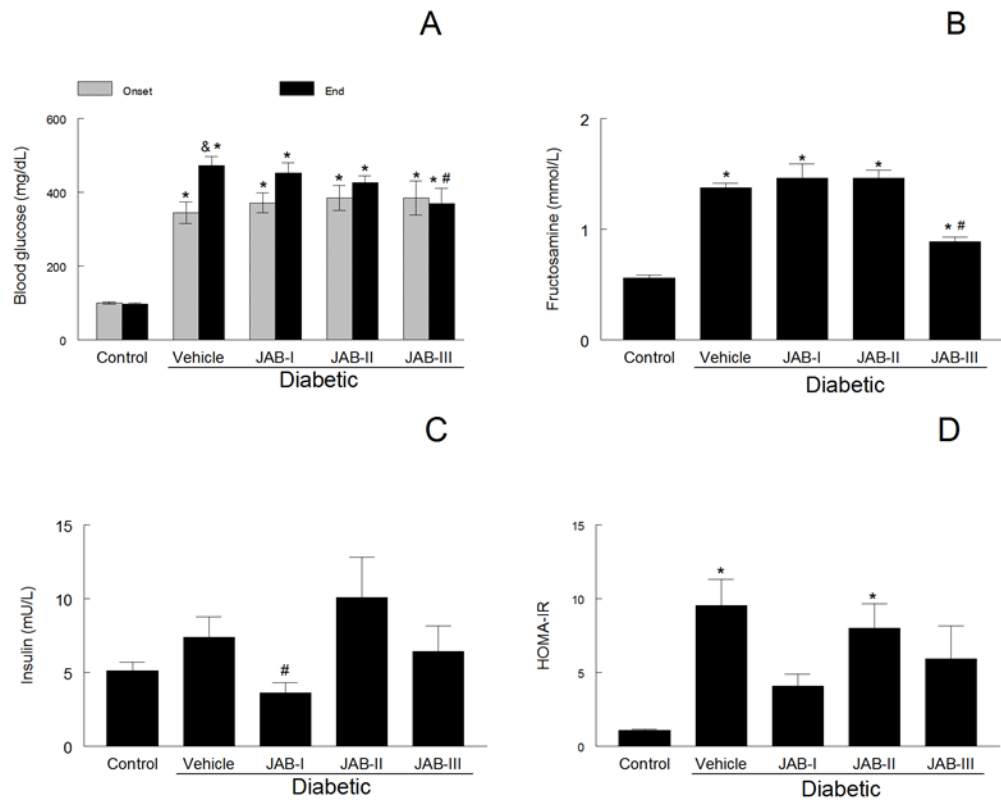


Figure 4:

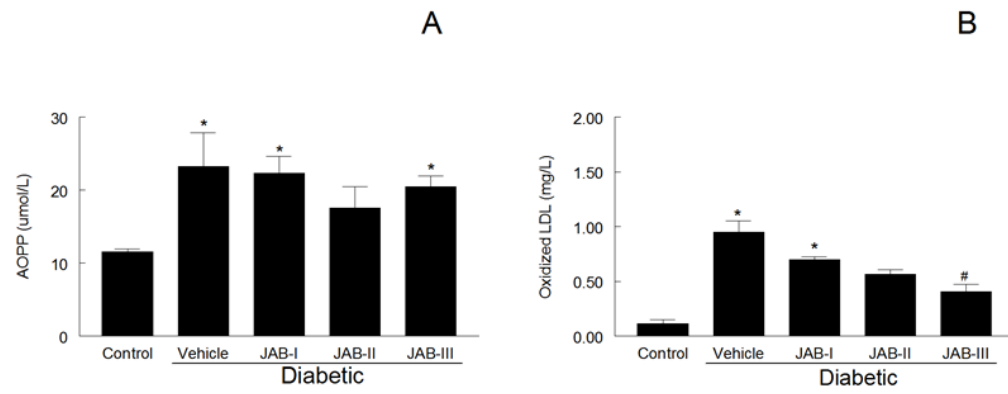


Figure 5:

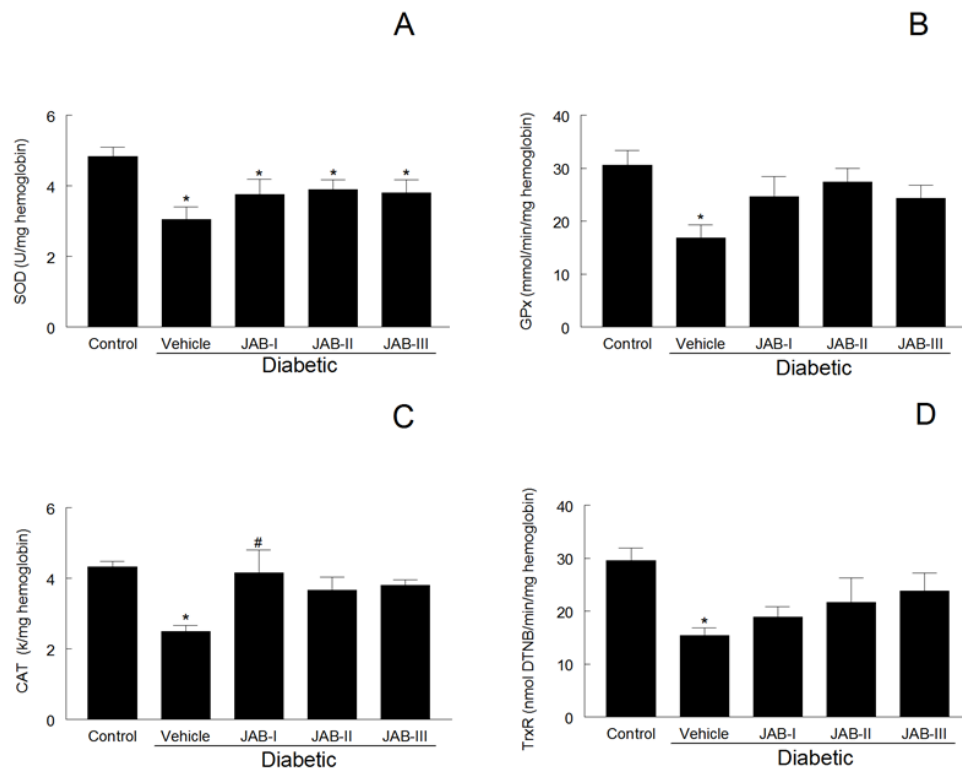


Figure 6:

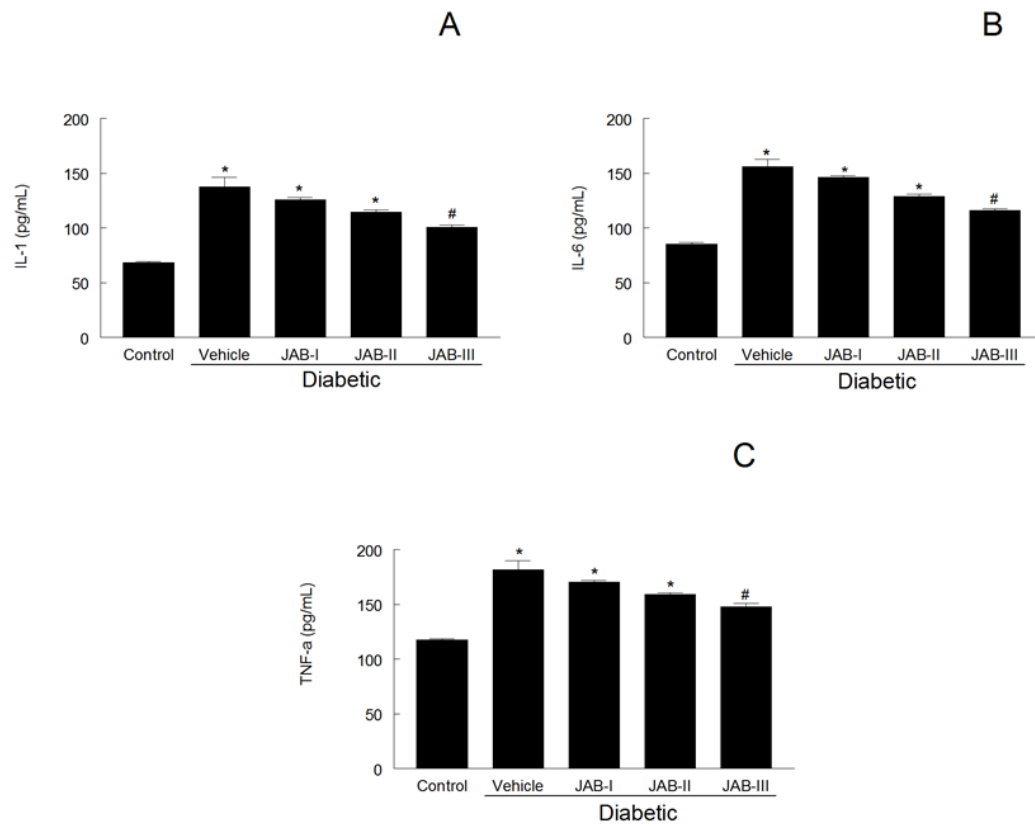


Figure 7:

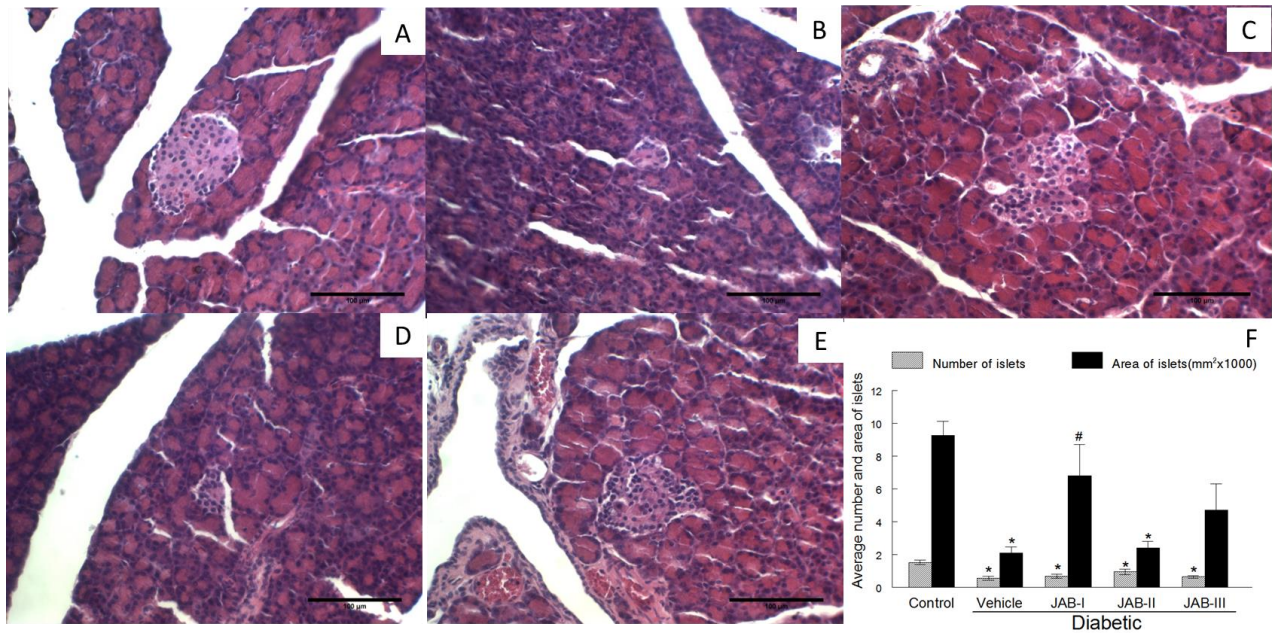
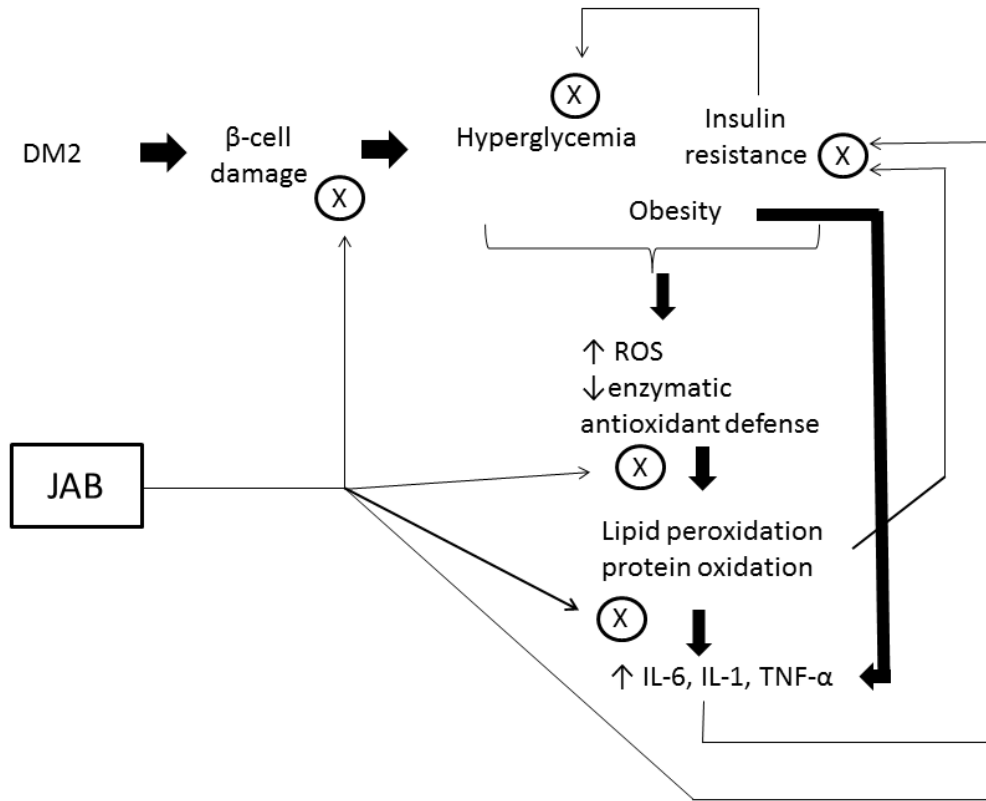


Figure 8:



4. CONCLUSÃO

Utilizando o modelo de DM2 induzida por dieta hipercalórica e uma dose baixa de STZ em ratos, concluiu-se que:

- O tratamento por 8 semanas com pó da casca de jabuticaba, embora não tenha revertido totalmente as alterações causadas pelo diabetes, apresentou ação hipoglicemiante, atenuou a resistência à insulina, reduziu o ganho de peso e a gordura corporal;

- O tratamento com pó da casca de jabuticaba reduziu o estresse oxidativo e preveniu a redução na atividade das enzimas antioxidantes causados pelo diabetes;

- O tratamento com pó da casca de jabuticaba reduziu o processo inflamatório envolvido no DM2;

- O tratamento com pó da casca de jabuticaba reduziu o dano pancreático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AGUILAR-BRYAN, L. et al. Cloning of the β cell high-affinity sulfonylurea receptor : A regulator of insulin secretion. **Science**, v. 268, n. April, p. 423–426, 1995.
- AGUIRRE, V. et al. The c-Jun NH₂-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser 307 *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 9047–9054, 2000.
- ALEZANDRO, M. R. et al. Comparative study of chemical and phenolic compositions of two species of jaboricaba : *Myrciaria jaboricaba* (Vell.) Berg and *Myrciaria cauliflora*. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 468–477, 2013a.
- ALEZANDRO, M. R.; GRANATO, D.; GENOVESE, M. I. Jaboricaba (*Myrciaria jaboricaba* (Vell.) Berg), a Brazilian grape-like fruit, improves plasma lipid profile in streptozotocin-mediated oxidative stress in diabetic rats. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 650–659, 2013b.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Disponível em: < www.diabetes.org.br>. Acesso em: 22 nov. 2013a.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes--2013. **Diabetes care**, v. 36, n. Supplement 1, p. S11–66, 2013b.
- ANHÊ, F. F. et al. Polyphenols and type 2 diabetes: A prospective review. **PharmaNutrition**, v. 1, p. 105–114, 2013.
- ANNUZZI, G. et al. Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance. **Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases : NMCD**, v. 18, n. 8, p. 531–538, 2008.
- ARYA, A. et al. The methanolic fraction of *Centratherum anthelminticum* seed downregulates pro-inflammatory cytokines , oxidative stress , and hyperglycemia in STZ-nicotinamide-induced type 2 diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4209–4220, 2012.
- BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor- κ B — a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 15, p. 1066–1071, 1997.
- BASTA, G. et al. Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: A mechanism for amplification of inflammatory responses. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 816–822, 2002.

BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular Research**, v. 63, n. 4, p. 582–592, 2004.

BATISTA, A. G. et al. Intake of jaboticaba peel attenuates oxidative stress in tissues and reduces circulating saturated lipids of rats with high-fat diet-induced obesity. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 450–461, 2014.

BERTHET, S. et al. Drug safety of rosiglitazone and pioglitazone in France: a study using the French Pharmacovigilance database. **BMC Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 5, p. 1-6, 2011.

BITSCH, R. et al. Bioavailability and biokinetics of anthocyanins from red grape juice and red wine. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 293–298, 2004.

BLOCH-DAMTI, A.; BASHAN, N. Proposed Mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 7, n. 134, p. 1553–1567, 2005.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 13, p. 813–820, 2001.

BRUNINI, M. A. et al. Influência de embalagens e temperatura no armazenamento de jaboticabas (*Myrciaria jaboticaba* (Vell) Berg) cv “SABARÁ”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p. 378–383, 2004.

BUSE, M. G. Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. **American Journal of Physiology Endocrinol Metabolism**, v. 290, n. 1, p. 1–15, 2007.

BUTLER, A. E. et al. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, n.1, p. 102-110, 2003.

CAO, G. et al. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women : a pharmacokinetic study 1 – 4. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 920–926, 2001.

CAPEILLÈRE-BLANDIN, C. et al. Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. **Biochimica et Biophysica acta**, v. 1689, n. 2, p. 91–102, 2004.

CNOP, M. et al. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 97–107, 2005.

COLETTI, L. Y. Curva de maturação de frutos e potencial germinativo de sementes de jaboticaba “Sabará”(Mircyaria jaboticaba Berg). **Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo- Escola Superior de Agricultura“Luiz de Queiroz”, Piracicaba**, p. 60, 2012.

CRESPY, V. et al. Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. **The Journal of Nutrition**, n. February, p. 2109–2114, 2001.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001–43, 2009.

DAOUSI, C. et al. Prevalence of obesity in type 2 diabetes in secondary care: association with cardiovascular risk factors. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p. 280–284, 2006.

DAS EVCIMEN, N.; KING, G. L. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 6, p. 498–510, 2007.

DEFURIA, J. et al. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1510–1516, 2009.

DONADIO, L. C. Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Jaboticabal: Funep**. p. 55

DRAGANO, N. R. V et al. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **The British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 447–455, 2013.

EVANS, J. L. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 599–622, 2002.

FELGINES, C. et al. Strawberry anthocyanins are recovered in urine as glucuro- and sulfoconjugates in humans. **The Journal of Nutrition**, v.133, n.5, p. 1296–1301, 2003.

FELGINES, C. et al. Absorption and metabolism of red orange juice anthocyanins in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 898–904, 2006.

FESHANI, A. M.; KOUHSARI, S. M.; MOHAMMADI, S. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan-diabetic Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 67–74, 2011.

FONG, D. S. et al. Diabetic retinopathy. **Diabetes CARE**, v. 26, n. 1, p. 99–102, 2003.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids : Role of (–)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 813–823, 2011.

GALLEANO, M. et al. Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, n. 1, p. 23–30, 2010.

GASTALDELLI, A. et al. Thiazolidinediones improve β -cell function in type 2 diabetic patients. **American Journal Physiological Endocrinol Metabolism**, v. 78229, n. 14, p. 871–883, 2006.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications. **Circulation Research**, v. 106, p. 1058–1070, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine** 5th ed., Clarendon Press: Oxford, 1999.

HANHINEVA, K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p. 1365–402, 2010.

HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. Generation and propagation of radical reactions on proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1504, p. 196–219, 2001.

HOLMGREN, A.; BJÖRNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 199–208, 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. January, p. 87–91, 1993.

HUSSAIN, G. et al. Serum levels of TNF- α in peripheral neuropathy patients and its correlation with nerve conduction velocity in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 7, n. 4, p. 238–242, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **DIABETES ATLAS** Sixth edition.

JOHNSON, A. B. et al. A.B. Johnson, J.M. Webster, C.-F. Sum, L. Heseltine, M. Argyraki, B.G. Cooper, and R. Taylor. **Metabolism**, v. 42, n. 9, p. 1217–1222, 1993.

JØRGENSEN, C. H. et al. Effects of oral glucose-lowering drugs on long term outcomes in patients with diabetes mellitus following myocardial infarction not treated with emergent percutaneous coronary intervention - a retrospective nationwide cohort study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 9, n. 54, p. 1–9, 2010.

KAHN, S. E. CLINICAL REVIEW 135 The importance of β cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4047–4058, 2001.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840–846, 2006.

KALT, W. et al. Identification of anthocyanins in the liver, eye, and brain of blueberry-fed pigs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 705–12, 2008.

KARIM, M. N. et al. Pattern and predictors of dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 7, n. 2, p. 95–100, 2013.

KARIN, M. How NF- κ B is activated : the role of the I κ B kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, p. 6867–6874, 1999.

KARIN, M.; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation meets ubiquitination : the control of NF- κ B activity. **Annual Review of Immunology**, v. 18, p. 621–663, 2000.

KASSAB, A.; PIWOWAR, A. Biochimie cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. **Biochimie**, v. 94, n. 9, p. 1837–1848, 2012.

KAUL, S.; DIAMOND, G. A. Rosiglitazone and cardiovascular risk. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 10, n. 5, p. 398–404, 2008.

KAY, C. D. Aspects of anthocyanin absorption, metabolism and pharmacokinetics in humans. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, n. 1, p. 137–46, 2006.

KEPPLER, K.; HUMPF, H. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5195–5205, 2005.

KIRPICHNIKOV, D.; MCFARLANE, S. I.; SOWERS, J. Metformin: an update. **Annals of Internal Medicine**, v. 137, n. 2, p. 25–33, 2002.

KONG, J. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923–933, 2003.

LEAHY, J. L. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 197–209, 2005.

LEITE, A. V et al. Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2277–83, 2011.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel : Antioxidant compounds , antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596–603, 2012.

LENQUISTE, S. A. et al. Freeze-dried jaboticaba peel added to high-fat diet increases HDL-cholesterol and improves insulin resistance in obese rats. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 153–160, 2012.

LEVINE, R. L. . et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 164–178, 1990.

MAEDLER, K. et al. Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 6, p. 851–860, 2002.

MAHMOUD, A. M. et al. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-

induced type 2 diabetic rats. **Journal of diabetes and its complications**, v. 26, n. 6, p. 483–90, 2012.

MANDRUP-POULSEN, T. Type 2 diabetes mellitus: a metabolic autoinflammatory disease. **Dermatologic Clinics**, v. 31, n. 3, p. 495–506, 2013.

MARTÍN-GALLÁN, P. et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 12, p. 1563–1574, 2003.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems : involvement of glutathione and glutathione-related enzymes B. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577–586, 2005.

MATSUDA, M.; SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity : Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, n. 5, p. e330–e341, 2013.

MATSUMOTO, H. et al. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 83, n. 2, p. 348–56, 2006.

MATSUURA, E.; HUGHES, G. R. V; KHAMASHTA, M. A. Oxidation of LDL and its clinical implication. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, n. 7, p. 558–66, jul. 2008.

MAY, J. M.; MORROW, J. D.; BURK, R. F. Thioredoxin reductase reduces lipid hydroperoxides and spares α -tocopherol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 49, n. 1, p. 45–49, 2002.

MAYNE, S. T. Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status antioxidant nutrients and chronic disease : Use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research 1. **The Journal of Nutrition**, n. 2, p. 933–940, 2003.

MCDOUGALL, G. J. et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2760–6, 2005.

MEHTA, J. L. et al. Oxidative stress in diabetes: a mechanistic overview of its effects on atherogenesis and myocardial dysfunction. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. (5-6), p. 794–803, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DIABETES MELLITUS Cadernos de Atenção Básica - n.º 16. v. 7-56, 2006.

MIRZA, S. et al. Type 2-diabetes is associated with elevated levels of TNF-alpha , IL-6 and adiponectin and low levels of leptin in a population of Mexican Americans : A cross-sectional study. **Cytokine**, v. 57, n. 1, p. 136–142, 2012.

MIYAZAKI, Y. et al. Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic. **Diabetes CARE**, v. 24, n. 4, p. 710–719, 2001.

MOCO, S.; MARTIN, F.-P. J.; REZZI, S. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 10, p. 4781–90, 2012.

MOHD-RADZMAN, N. H. et al. Potential Roles of Stevia rebaudiana Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 718049, jan. 2013.

NARASIMHAN, S. et al. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 10-11, p. 815–821, 2010.

NATALI, A.; FERRANNINI, E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes : a systematic review. **Diabetologia**, v. 49, p. 434–441, 2006.

OGIHARA, T. et al. Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor- κ B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. **Diabetologia**, v. 47, p. 794–805, 2004.

PIETTA, P.; ABOUT, M.; ARTICLE, T. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035–1042, 2000.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 50, n. 5, p. 567–75, 2011.

REED, M. J. et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 11, p. 1390–1394, 2000.

REUTER, T. Y. Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 4, n. 1, p. 3–8, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROEHRS, M. et al. Bixin and Norbixin have opposite effects on glycemia, lipidemia, and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

SAAD, M. J. A.; ZECCHIN, H. G. Resistência à insulina no diabetes tipo 2. In: **Diabetes na Prática Clínica**, 2011. Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: <www.diabetesbook.org.br>. Acesso em: 3 dez. 2013.

SALTIEL, A. R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 517–529, 2001.

SANCHO, R. A. S.; PASTORE, G. M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 378–386, 2012.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.

SCHAFFER, S. W.; JON, C. J.; MOZAFFARI, M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction : Unifying hypothesis of diabetes revisited mechanisms of vascular dysfunction in diabetes mechanisms of vascular dysfunction in diabetes. **Vascular Pharmacology**, v. 57, n. 5-6, p. 139–149, 2012.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity : modulation by nutrients and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 9, 2008.

SESTI, G. Pathophysiology of insulin resistance. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 665–79, dez. 2006.

SHARMA, B.; BALOMAJUMDER, C.; ROY, P. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of flavonoid rich extract from Eugenia jambolana seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2376–83, 2008.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1793–1801, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES**, 3 ed., Itapevi- SP, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. In: **Algoritmo para o Tratamento do Diabetes Tipo 2 Atualização 2011**. Disponível em:

<<http://www.diabetes.org.br/attachments/posicionamento/posicionamento-sbd-n-03-2011.pdf>>. Acesso em: 4 dez. 2013.

SOLINAS, G.; KARIN, M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, p. 2596–2611, 2010.

SPANIER, G. et al. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD 1), glutathione peroxidase 1 (GPx 1) and NADPH oxidase subunit (NOX4). **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 111–116, 2009.

SPIEGELMAN, B. M. PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. **Diabetes**, v. 47, n. 3, p. 507–514, 1998.

SPRANGER, J. et al. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes results of the prospective population-based european prospective investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. **Diabetes**, v. 52, n. March, p. 812–817, 2003.

SRINIVASAN, K. et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening.

Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society, v. 52, n. 4, p. 313–20, out. 2005.

SUGIMOTO, E. et al. Protective effects of boysenberry anthocyanins on oxidative stress in diabetic rats. **Food Science Technology Research**, v. 9, n. 4, p. 345–349, 2003.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, v. 50, n. 6, p. 537–46, jan. 2001.

TAKIKAWA, M. et al. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. **The Journal of Nutrition**, v. 140, n. 3, p. 527–533, 2010.

TALAVÉRA, S. et al. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 12, p. 4178–82, 2003.

TALAVÉRA, SÉVERINE FELGINES, C. et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area , kidney , and brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3902–3908, 2005.

TEO, C. F.; WOLLASTON-HAYDEN, E. E.; WELLS, L. Hexosamine flux, the O-GlcNAc modification, and the development of insulin resistance in adipocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 318, p. 44–53, 2010.

THAKKAR, B. et al. Metformin and sulfonylureas in relation to cancer risk in type ii diabetes patients: A meta-analysis using primary data of published studies. **Metabolism**, v. 62, n. 7, p. 922–934, 2013.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, p. 145–155, 2003.

TURNER, R. C. et al. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). **The Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 21, p. 2005–2012, 1999.

UKPDS PROSPECTIVE DIABETES STUDY. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). **The Lancet**, v. 352, p. 854–865, 1998a.

UKPDS PROSPECTIVE DIABETES STUDY. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **The Lancet**, v. 352, p. 837–853, 1998b.

VALKO, M. et al. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. v. 39, p. 44–84, 2007.

- VAN DAM, R. M. et al. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. **Annals of internal medicine**, v. 136, n. 3, p. 201–209, 2002.
- VAN DEN OEVER, I. A M. et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. **Mediators of inflammation**, v. 2010, p. 1–15, 2010.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.
- VERGÈS, B. New insight into the pathophysiology of lipid abnormalities in type 2 diabetes. **Diabetes Metabolism**, v. 31, p. 429–439, 2005.
- VILLACORTA, L.; AZZI, A.; ZINGG, J. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 28, p. 507–537, 2007.
- WANG, H. J. et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. Suppl 1, p. 412–417, 2007.
- WANG, J. et al. Acarbose plus metformin fixed-dose combination outperforms acarbose monotherapy for type 2. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 102, p. 16–24, 2013.
- WASSMANN, S. et al. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. **Hypertension**, v. 44, p. 381–386, 2004.
- WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Serial Review : Flavonoids and Isoflavones (Phytoestrogens): Absorption, metabolism, and bioactivity serial Review Editor : Catherine Rice-Evans. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. In: **10 facts about diabetes**. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index.html>>. Acesso em: 22 nov. 2013a.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en>>. Acesso em: 20 nov. 2013b.
- WU, S. et al. Metabolite profiling of Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.
- WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 148–159, 2013.

- WU, X. et al. Aglycones and sugar moieties alter anthocyanin absorption and metabolism after berry consumption in weanling pigs. **The Journal of Nutrition**, p. 2417–2424, 2005.
- XIE, C. et al. Açai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. **Atherosclerosis**, v. 216, n. 2, p. 327–33, 2011.
- YAMAGISHI, S. et al. Biochimica et biophysica acta role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 5, p. 663–671, 2012.
- YKI-JÄRVINEN, H. Thiazolidinediones. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 11, p. 1106–1118, 2004.
- YOSHIDA, H.; KISUGI, R. Mechanisms of LDL oxidation. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 23-24, p. 1875–82, 2010.
- YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50230–6, 2002.
- ZHANG, B. et al. Anthocyanins from Chinese bayberry extract protect β cells from oxidative stress-mediated injury via HO-1 upregulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 537–45, 2011.
- ZHENG, X.-K. et al. Anti-diabetic activity and potential mechanism of total flavonoids of *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring in rats induced by high fat diet and low dose STZ. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 662–668, 2011.