



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

THIAGO GOMES DE AMORIM

**EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE Mo-D3, UMA FRAÇÃO PROTEICA OBTIDA DAS
FOLHAS DE *Moringa oleifera* LAM.**

FORTALEZA

2023

THIAGO GOMES DE AMORIM

**EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE Mo-D3, UMA FRAÇÃO PROTEICA OBTIDA DAS
FOLHAS DE *Moringa oleifera* LAM.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de bacharel em biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Daniele de Oliveira
Bezerra de Sousa.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A545e Amorim, Thiago Gomes de.

Efeito hipoglicemiante de Mo-D3, uma fração proteica obtida das folhas de Moringa oleifera Lam /
Thiago Gomes de Amorim. – 2023.

35 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa.

1. Diabetes mellitus . 2. Moringa oleifera. 3. Insulina. I. Título.

CDD 661

THIAGO GOMES DE AMORIM

**EFEITO HIPOGLICEMIANTE DE Mo-D3, UMA FRAÇÃO PROTEICA OBTIDA DAS
FOLHAS DE *Moringa oleifera* LAM.**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Biotecnologia da Universidade Federal do
Ceará, como requisito parcial à obtenção
do grau de bacharel em biotecnologia.

Aprovada em: 12/07/23

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Larissa Alves Lopes De Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe por ser a mulher mais
fascinante da minha vida e a todos que
conheci durante essa incrível caminhada.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe por nunca ter deixado de me apoiar em nenhum momento da minha vida, sua ajuda me tornou quem sou hoje, agradeço por cada noite sem dormir e cada ligação de preocupação seja ela às 08:00 h da manhã ou as 23:00 h da noite, meu amor por você é imensurável. Te amo mil milhões.

A minha irmã e meus sobrinhos por me fazerem perceber que a distância dói e a saudade machuca lentamente, estar longe me deu força para seguir em frente e trabalhar duro para ter sempre um final de semana ao lado de vocês.

As minhas outras irmãs Gabrielly e Vitória, só tenho a agradecer por tornar tudo mais vivo, sereno e perfeito. Eu amo muito vocês, a gente se completa de diversas formas e estar perto de vocês renova minha energia completamente, se eu fosse um painel solar vocês sem dúvida alguma seriam o meu sol.

Ao Labtox que apesar do nome é um ambiente de trabalho maravilhoso e prazeroso e nele fiz amizades lindas, Larissa, Nadine, Leite e Camila. Obrigado por me ensinarem tanto, vocês ajudaram a moldar o perfil profissional que tenho hoje, amo muito vocês.

Ao LFB por ser minha segunda casa e por também ter pessoas incríveis que te apoiam e anseiam pelo seu êxito tanto quanto você, em especial a Professora Marisa, Professora Nylane, Karen, Landerson, Gabi e as duas Beatriz, obrigado por tanto.

Aos meus amigos do Lanci que levarei para a vida toda, sendo a minha primeira experiência de IC e o primeiro passo na formação de um pesquisador, amo vocês Bia, Max, Mateus, Rian, Professor Richard e Professora Camilla.

A melhor orientadora que alguém pode ter, Dani, obrigado por sempre acreditar em mim e me dar forças, me dediquei imensamente a esse trabalho, porque você sempre é uma mãe para nós no laboratório. Então só tenho a agradecer por você ter entrado na minha vida e agradecer ao Guilherme por permitir que as nossas histórias se cruzassem.

Aos meus amigos mais íntimos da biotecnologia, talvez eu seja muito sociável e tenham muitos abordados neste parágrafo, obrigado por serem seres humanos tão incríveis e me fazerem tão feliz, eu amo muito vocês em especial o Pedro, Eric, Luan, Arlene, Gui, Carol, Duda, Débora, Samuel, Levi, Yandra e Ianah, Paulo Victor e a minha ex colega de ensino médio e futura farmacêutica Bia.

Agradecer as minhas 4 filhas “calouras” da biotecnologia, eu tenho tanto orgulho de vocês e fico feliz se de alguma forma eu ajudei vocês a se encontrar dentro desse curso tão difícil, ver vocês alcançando seus objetivos e conseguir superar cada adversidade me faz muito feliz, me desculpem se não ajudei em algum momento que vocês precisavam, todavia saibam que podem contar comigo sempre que precisarem. Amo vocês Alana, Bia, Julia e Larissa.

Por fim gostaria de agradecer imensamente a UFC, pois sem todo o auxílio financeiro e o acompanhamento psicológico esse momento nunca seria uma realidade, agradeço em especial a minha Psicóloga Cláudia por me colocar no eixo e me ajudar a não deixar a ansiedade me controlar, se continuo aqui hoje é graças a você e aos meus colegas que me levaram a te conhecer.

“Todo encontro leva a uma partida, e assim seria, enquanto a vida fosse mortal. Em todo encontro, havia um pouco da tristeza da separação, mas, em toda separação, havia um pouco da alegria do encontro.”
(Clare, 2013).

RESUMO

Dados levantados pela federação internacional de diabetes (IDF), demonstraram o crescimento comum da doença em todos os continentes do mundo, o que nos leva a ressaltar a importância de estudos e investimentos na área de pesquisa associada a esta comorbidade. A mesma caracteriza-se como uma doença crônica multifatorial responsável por alterar a homeostase do organismo, ou seja, está relacionada a diversos fatores e devido a isto também leva a geração de diversas doenças secundárias, que em baixo índice de casos quando avaliadas por profissionais da saúde não são relacionadas ao diabetes mellitus. Diversos estudos publicados nos mostram a eficácia da utilização de moléculas naturais derivadas de plantas, sendo essas considerados possíveis tratamentos alternativos para os hipoglicemiantes orais que atualmente estão disponíveis no mercado para o tratamento dessa enfermidade. Com base nisso a nossa equipe de pesquisa analisou uma porção proteica extraída das folhas de *Moringa oleifera* que apresentou um efeito hipoglicemiante em modelos *in vivo* induzidos a diabetes. Desse modo foi realizada a extração é um método de purificação para a obtenção da fração responsável pela atividade hipoglicemiente, visando a caracterização do mecanismo de ação do extrato proteico denominado Mo-D3. Para isso a extração foi realizada a partir das folhas da *Moringa* com a utilização de tampão Tris-HCl com pH de 7,5, seguido por salting-out com sulfato de amônia e realização de dois processos de separação cromatográficos. Os resultados obtidos após a realização dos testes de tolerância a glicose e o cálculo para a presença de glicogênio no fígado e no músculo, sendo acompanhados de cálculos estatísticos utilizando os testes ANOVA e Bonferroni para a afirmação dos resultados, foram que a Mo-D3 apresenta efeitos hipoglicemiantes em camundongos hiperglicêmicos, aumentando o glicogênio hepático e muscular. De modo que se pode concluir que a fração proteica estudada apresenta resultados que necessitam de maiores estudos, todavia são promissores para o tratamento da diabetes.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, *Moringa oleifera*, insulina.

ABSTRACT

Data compiled by the international diabetes federation (IDF), support the common growth of the disease in all continents of the world, which leads us to emphasize the importance of studies and investments in the research area associated with this comorbidity. It is characterized as a multifactorial chronic disease responsible for altering the body's homeostasis, that is, it is related to several factors and because of this it also leads to the generation of several secondary diseases, which in a low rate of cases when evaluated by professionals of health are not related to diabetes mellitus. Several published studies show us the effectiveness of using natural molecules derived from plants, which are considered possible alternative treatments for the oral hypoglycemic agents that are currently available on the market for the treatment of this disease. Based on this, our research team analyzed a protein portion extracted from *Moringa oleifera* leaves that showed a hypoglycemic effect in in vivo models of diabetes. In this way, the extraction was carried out as a purification method for obtaining the fraction responsible for the hypoglycemic activity, aiming at characterizing the mechanism of action of the protein extract called Mo-D3. For this, the extraction was carried out from *Moringa* leaves using a Tris-HCl buffer with a pH of 7.5, followed by salting-out with ammonium sulfate and carrying out two chromatographic separation processes. The results obtained after carrying out the glucose tolerance tests and the calculation for the presence of glycogen in the liver and muscle, accompanied by statistical calculations using the ANOVA and Bonferroni tests to confirm the results, were that Mo-D3 presents Hypoglycemic effects in hyperglycemic mice by increasing liver and muscle glycogen. So, it can be concluded that the protein fraction studied presents results that need further studies, however they are promising for the treatment of diabetes.

Keywords: Diabetes mellitus, *Moringa oleifera*, insulin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-celulose (1,0 cm x 15 cm). Mo-24
LPI (7 mg) foi aplicada numa coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. As frações retidas (D2, D3 e D4) foram eluidas com o mesmo tampão de equilíbrio acrescentado de NaCl 0,15 M, 0,3 M e 1,0 M, respectivamente. A seta vermelha indica a fração proteica com a atividade hipoglicemizante. (B) Eletroforese (SDS-PAGE)
- Figura 2 - Efeito de Mo-D3 no teste de tolerância à glicose (TTG) em camundongos 25
- Figura 3 - Efeito da fração proteica de Mo-D3 nos teores de glicogênio hepático (A) e 27
muscular (B) de camundongos hiperglicêmicos. Os valores são expressos como média \pm S.E.M.; n=7 em duplicita para cada grupo. Com intervalo de significância de * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; em relação ao grupo controle hiperglicêmico
- Figura 4 - Efeito da dexametasona (A) e a fração protéica de Mo-D3 (B) no teste de 28
tolerância à insulina. ** $P \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, comparado com o grupo controle (salina) e # $p \leq 0,01$ quando comparado ao grupo dexametasona
- Figura 5 - Efeito de Mo-D3, na expressão dos genes GLUT4 (A), PI3K (B), AKT (C) de 29
músculos de camundongos resistentes à insulina induzida por dexametasona por 5 dias. Os valores são expressos na média \pm E.P.M.; n = 5. Significância para * $p \leq 0,05$ comparado respectivamente ao grupo controle (Salina) e # $p \leq 0,05$ comparado ao grupo insulino resistente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da fração proteica Mo-D3 no teste de tolerância à glicose. 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

UFC – Universidade Federal do Ceará

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil

DEAE – Dietilaminoetil celulose

PVPP – Polivinilpolipirrolidona

kDa – Quilodalton

BSA- Albumina de soro bovino

I.P – Intraperitoneal

S.C – Subcutânea

NPDM – Núcleo de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	METODOLOGIA.....	19
2.1	Obtenção do material da <i>Moringa</i>	19
2.2	Animais	19
2.3	Preparação do extrato e obtenção da fração de <i>Moringa oleifera</i>	20
2.4	Cromatografia	20
2.5	Quantificação de proteínas	20
2.6	Eletroforese	21
2.7	Curva de Tolerância à glicose	21
2.8	Teor de glicogênio	21
2.9	Teste de tolerância a insulina	22
2.10	PCR em tempo real	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4	CONCLUSÃO	31
5	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

O diabetes se caracteriza como uma doença ocasionada por um distúrbio no metabolismo da glicose causado pela falta de secreção ou a diminuição da sensibilidade nos tecidos a insulina, mais especificamente ocorre o acúmulo de glicose no sangue, hiperglicemia, e a secreção dessa substância sem que a mesma apresente sua utilidade energética, tão pouco sinalizadora, sendo esta responsável pela liberação da insulina das células β pancreáticas, essencial para o metabolismo das gorduras e proteínas, desse modo sabe-se que a regulação nos níveis de glicose no sangue se baseia através de um feedback negativo que atua através da liberação de insulina e também glucagon. A insulina atua como o hormônio responsável pela regulação da glicose no sangue e o deslocamento para as células com destaque para as do músculo, tecido adiposo e principalmente o fígado. (KAUL, 2012)

O organismo coleta glicose através de três vias: a absorção intestinal de alimentos, degradação do glicogênio e gliconeogênese, sendo a insulina o hormônio que pode inibir ou redirecionar as vias citadas, sendo ele liberado no sangue pelas células β como uma resposta ao aumento dos níveis de glicose no sangue que em situação sem distúrbios é gerada devido a clivagem dos nutrientes obtidos durante a alimentação. Por sua vez o Glucagon atua como o hormônio contrário a insulina, já que ele regula a liberação de insulina quando há baixos níveis de glicose. (CHINAZA et al., 2019)

A diabetes mellitus pode ser classificada em tipo 1 e tipo 2, sendo que o primeiro consiste na destruição das células β das ilhotas de Langerhans impossibilitando a produção de insulina, desse modo quando a insulina não é direcionada do pâncreas devido à falta de sua produção o corpo não consegue absorver a glicose do sangue ocasionando uma hiperglicemia, para que isso ocorra cerca de 90% da células beta pancreáticas são destruídas o que pode indicar uma predisposição genética para que tal atividade aconteça antes dos 30 anos que é a fase em que a doença mais se expressa. (ARAÚJO, BRITO E CRUZ 2000)

Quando relacionada ao tipo 2, a diabetes se caracteriza pela síntese de modo insuficiente de insulina que resulta na cascata metabólica já citada anteriormente. “Ela é responsável por aproximadamente 90% de todos os diabetes em todo o mundo. A incidência e prevalência de Diabetes mellitus tipo 2 aumenta com a idade (KAUL, 2012)”.

No ano de 2021 os dados levantados pela federação internacional de diabetes nos mostram o impacto que essa enfermidade causa no mundo, ela foi responsável por cerca de 6,7 milhões de mortes, uma a cada cinco segundos e segundo as projeções ela causou

um gasto de aproximadamente 966 bilhões de dólares o que equivale a um aumento de 15% nos últimos 15 anos, o que impacta diretamente na necessidade de novos métodos de tratamentos e diagnósticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, DIABETES ATLAS 2021).

Quando relacionado ao Brasil os Dados epidemiológicos da doença no país destacam o aumento de casos no ano de 2019 e o salto que o nível de mortalidade que a diabetes mellitus fez no Brasil quando comparado às demais doenças, pulando um total de 8 posições, 11^a posição no ano de 1990, e assumindo o terceiro lugar no ano de 2019 como uma das maiores causas de morte da população brasileira. Os gastos no Brasil para o tratamento da diabetes estão classificados como o segundo maior dentre os 10 países que mais possuem pessoas portadores dessa desregulação metabólica, isso nos indica que o tratamento brasileiro sai mais caro, mesmo o país sendo o quinto colocado em número de pessoas portadoras de diabetes mellitus. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

A diabetes encontra-se diretamente associada a neuropatias e outras doenças que são prejudiciais na qualidade de vida da população, por exemplo grande responsável da cegueira adquirida, fator de risco para doenças cardiovasculares e amputações de membros inferiores. Cerca de 537 milhões de pessoas ao redor do mundo possuem a doença (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, DIABETES ATLAS 2021, PAULA et al 2017), o que alerta os pesquisadores devido ao fato de que novas enfermidades surgem com o decorrer dos anos, sendo que algumas destas podem vir a afetar diretamente essa parcela da população aumentando o seu índice de mortalidade.

Dados que fortalecem essa teoria foi a correlação estabelecida entre a Covid-19 e os pacientes com diabetes, a Covid-19 foi responsável por uma pandemia a nível global e milhares de mortes, diversos estudos relatam a correlação entre a alteração metabólica devido a um crescimento significativo de glicose no sangue que se explica pelo aumento de citocinas, como também mediadores inflamatórios ocasionando assim uma elevação na resistência à insulina e a hiperglicemia, fator este responsável pela maior suscetibilidade a infecções e a progressão para doenças críticas em pacientes com a Covid-19. (HUANG et. Al., 2020)

Portadores da diabetes mellitus quando não estão seguindo um tratamento ou ainda não obtiveram o diagnóstico da mesma tendem a apresentar sintomas diversos, tais como perda de peso, sede constante, poliúria e fome incessante, sendo menos comum, mas ainda presente e podendo estar relacionado a outras enfermidades tem-se a lenta cicatrização de feridas, visão turva e fadiga. Vale ressaltar que a cegueira adquirida em portadores dessa

doença é comum devido ao elevado tempo do paciente com hiperglicemia e sem um tratamento, uma vez que esse excesso ocasiona a absorção de glicose no cristalino do olho alterando a sua conformação e resultando em alterações na visão. Como já citado anteriormente a diabetes é um fator de risco para doenças cardiovasculares, dobrando os riscos e tendo como dados que de todas as mortes de portadores de DM, cerca de 75% é causada por doença arterial coronariana e a longo prazo essa característica é responsável por acidente vascular cerebral nestes pacientes. (CHINAZA, 2019).

As doenças cardiovasculares em diabéticos se explicam devido a resistência à insulina presente nos organismos desses indivíduos que por sua vez gera rigidez vascular, dislipidemia e inflamação sistêmica dos tecidos. Essa hiperglicemia presente ocasiona as doenças cardiovasculares através da ativação de proteínas quinase C que acumulam radicais do oxigênio e dissipam os antioxidantes intracelulares, sendo responsável por iniciar uma cascata metabólica onde os radicais de O₂ causam disfunção e aumentam expressão de genes pró-inflamatórios e pró-coagulantes. (RAJAA et al. 2019) Com base nisso é evidente a necessidade do investimento em novos insumos que auxiliem o combate a esses problemas sem a interação com outros medicamentos, uma alternativa viável a isso é o estudo de proteínas vegetais que apresentem efeitos hipoglicemiantes e possam vir a ser utilizados como possíveis insulino miméticos que possam facilitar o controle da hiperglicemia e diminuir os riscos de mortalidade dos diabéticos.

Ao decorrer dos anos a busca por esse novo método de proteínas bioativas que possam vir a substituir o uso da insulina devido a sua ação similar cresceram, uma vez que os efeitos colaterais do uso da insulina e as farmacoterapias disponíveis comercialmente para tratar o diabetes (isto é, sulfoniluréias, biguanidas, inibidores de α-glicosidase, glinida e drogas relacionadas à incretina) têm sido usadas como monoterapia ou em combinação para melhorar potencialmente a regulação glicêmica. No entanto, seu uso terapêutico é limitado devido aos efeitos colaterais comuns (WIDYAWATI et al., 2015, SEINO et al., 2017). Por exemplo, muitos medicamentos antidiabéticos estão se tornando menos eficazes ao longo do tratamento desta doença. Descobertas recentes mostram que a resistência aos medicamentos e os efeitos colaterais graves estão entre os principais problemas causados por essa classe de produtos farmacêuticos, incluindo insuficiência cardíaca, doença hepática e desconforto abdominal (WIDYAWATI et al., 2015, MARIN-PEÑALVER et al., 2016, CHAUDHURY et al., 2017). Portanto, controlar o diabetes usando medicamentos disponíveis comercialmente sem apresentar efeitos colaterais ainda é um grande desafio clínico.

A maioria das plantas que possuem uma finalidade antidiabética quando passam por avaliações farmacológicas apresentam atividades hipoglicemiantes, para atestar essa

atividade um método utilizado é o uso do aloxano, sendo este um derivado da pirimidina que se caracteriza por ser seletivo as células β -pancreáticas devido ocasionarem a inibição da glicoquinase. A busca pelos tratamentos alternativos relacionados aos dados anteriormente citados é responsável pelo crescimento do número de investigações por novas plantas que podem apresentar efeitos de novas biomoléculas hipoglicemiantes, uma vez que pode haver uma redução dos efeitos adversos quando há a utilização da terapia baseada nas proteínas de plantas.

O principal método de tratamento da diabetes mellitus ainda são os agentes hipoglicemiantes orais e injetáveis, juntamente com o uso da insulina. Esses medicamentos visam não apenas a redução da glicemia, mas sim a longo prazo seja viável restabelecer o metabolismo dos diabéticos ou de certa forma retardar ou prevenir doenças ocasionados pelo estabelecimento da hiperglicemia nesses indivíduos a longo prazo. Todavia os agentes anti inflamatórios produzidos pelo nosso organismo são os principais responsáveis pela resistência dos agentes hipoglicemiantes, consiste daí a importância da busca por novos métodos que auxiliem esta parcela da população e possibilite a eles uma melhor qualidade de vida. Sabe-se que os principais hipoglicemiantes consistem das biguanidas e sulfonilureias, classificados como hipoglicêmicos de primeira linha, entretanto visando o aumento da gama e eficácia dos medicamentos em um maior número de pessoas novas abordagens como as tiazolidinedionas, análogos da meglitinida e também os inibidores da α -glicosidase e os inibidores da DPP-4. (KUMAR et. Al., 2020)

Considerando as razões acima mencionadas, profissionais médicos tradicionais em todo o mundo têm recomendado produtos naturais e fitoterápicos como recursos terapêuticos alternativos para o tratamento do DM, bem como das comorbidades relacionadas (WANG et al., 2013). Além disso, há um interesse crescente no uso de compostos bioativos derivados de plantas (por exemplo, fitoterápicos) que podem ser potencialmente úteis para diferentes fins terapêuticos no tratamento dessa doença (WANG et al., 2015). Curiosamente, muitas espécies de plantas têm sido usadas na medicina tradicional, como por exemplo *Allium sativum L.*, *Pinus pinaster* e *Moringa oleifera L.* (PULOK et al., 2006 PAULA et al., 2017).

Allium sativum L. é popularmente conhecida como alho e está presente na alimentação da população mundial, sua atividade hipoglicemante vem sido amplamente estudada por trabalhos como os de Zacharias et al., 1980; Roman-Ramos et al., 1995; Kasuga et al., 1999, eles são responsáveis pela comprovação da alta atividade hipoglicêmica encontrada nessa espécie que ocorre devido a presença de S-alil cisteína, sendo ela a responsável pela redução da glicose sanguínea. (PULOK et al., 2006).

Pinus pinaster comumente nomeado de pinheiro bravo possui moléculas com propriedades hipoglicemiantes que são obtidas do tronco da sua árvore, já que ela contém proantocianidinas, catequina e epicatequina, com propriedades hipoglicemiantes e antioxidantes. Essas moléculas citadas apresentam uma atividade inibitória da α-glicosidase de modo a agirem similarmente ao hipoglicemiante oral acarbose que pertence a classe dos inibidores de α-glicosidase. (PAULA et al., 2017)

Visando os fatores citados a *Moringa oleifera* Lam é uma espécie conhecida pelos seus benefícios medicinais, pertencente à família moringaceae, ela apresenta funções biológicas que destacam no meio da pesquisa sendo elas anti-inflamatória, analgésica e outras, todavia o destaque maior se dá pela sua atividade antidiabética, devido a sua atividade hipoglicemiente que é a característica mais persistente em pacientes com diabetes mellitus. (ANDRADE et. Al., 2020).

Os metabólitos secundários sempre se classificaram como o maior foco dos estudos quando o assunto abordado era o potencial antidiabético fitoterápico, todavia o potencial das proteínas com atividades similares à insulina ganhou uma nova frente de estudo devido ao pouco foco e a resposta positiva quanto ao potencial hipoglicêmico dessas proteínas (XAVIER-FILHO et al., 2003, PAULA et al., 2017). A diferença da conformação da insulina de plantas quando comparada a bovina iniciou um novo ápice de prospecção de novas proteínas insulino miméticas, algumas descobertas nesse processo por exemplo foram por exemplo nas plantas: *V. unguiculata*, *Momordica charantia* e *Urtica pilulifera* que possuem proteínas com efeito hipoglicemiente (PAULA et al., 2017).

Desse modo o intuito deste trabalho é identificar os efeitos e mecanismo de ação da Mo-D3 uma fração protéica das folhas de *Moringa oleifera* Lam perante a realização de testes pertinentes para a obtenção de respostas significativas quanto às propriedades hipoglicemiantes do extrato e sua aplicação com fármacos de testes positivos e antagonistas para teste negativos, visando uma caracterização mais específica da sua atividade farmacológica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material da *Moringa*

As folhas da árvore *M. oleifera* foram coletadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado na cidade de Fortaleza, Brasil, no ano de 2022. Todavia *M. oleifera* não é uma espécie nativa do Brasil, sendo ela uma planta vindas da

Índia, desse modo não se fez necessário permissões legais para coletar o material vegetal. Assim, a partir das folhas foram realizados procedimentos experimentais para obtenção do extrato protéico.

2.2. Animais.

Camundongos machos (C57Bl/6) com idade entre 8 e 12 semanas foram obtidos do biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), localizado na cidade de Fortaleza, Brasil em Fortaleza, Brasil. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno e com acesso a água e ração *ad libitum*, mantidos em condições monitoradas de acordo com as orientações do comitê de ética institucional em uma temperatura: $23,0 \pm 2,0$ °C; fotoperíodo: 12\12; umidade de 45%–55%. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da UFC, Brasil (número do protocolo: 05040321 -0). Este Comitê estava ciente de que a possibilidade de morte e sofrimento dos animais era mínima considerando a familiarização com o protocolo utilizado e a linhagem dos camundongos.

2.3 Preparação do extrato e obtenção da fração proteica de *M. oleifera*.

Logo após a coleta, as folhas foram destacadas e lavadas com água destilada para remoção dos contaminantes e, secas em papel filtro, sendo armazenadas a 20 °C até o uso. As folhas limpas e secas foram congeladas e em seguida liofilizadas e pulverizadas com triturador, para obtenção de uma farinha visando uma melhor extração de proteínas. A farinha obtida foi macerada em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5, contendo 2% PVPP (m/v), 0,001 M PMSF e 0,01 M EDTA, na proporção de 1:5 (m/v), com a auxílio de cadinho e pilão. O macerado obtido foi incubado por 1 hora a 4°C, em seguida foi filtrado em pano de trama fina e, posteriormente, centrifugado a 15.000 x g por 30 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e as alíquotas do sobrenadante após nova filtração (extrato total) foram utilizadas para determinação de proteínas pelo método de Bradford (1976). As proteínas do extrato total foram precipitadas pelo método de salting-out com a adição de sulfato de amônio, na faixa de saturação de 0-90%. Após 18 horas, a suspensão foi centrifugada a 15.000 x g por 30 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o material precipitado foi dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, contendo NaCl 0,15 M e, em seguida, submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana com cut-off de 2 kDa. O material dialisado foi liofilizado, resultando no isolado de proteína hipoglicemiante que foi armazenado a -20 °C até ser utilizado em análises posteriores.

2.4. Cromatografia.

O isolado foi solubilizado em homogeneizador e submetido à centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aplicado a uma matriz DEAE-celulose, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. O processo cromatográfico ocorreu sob fluxo constante de 60 mL/h, do qual foram coletadas frações de 3 mL. Após a remoção das proteínas não retidas na matriz (Mo-D1) e uma fração proteica inicial retida na matriz por percolação da coluna cromatográfica com o tampão de equilíbrio adicionado de NaCl 0,15 M (Mo-D2), uma segunda fração retida foi eluída pela aplicação do tampão de equilíbrio contendo NaCl 0,3 M. Essa fração foi denominada Mo-D3. Finalmente, a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1,0 M para a obtenção da fração denominada Mo-D4.

2.5. Quantificação de proteínas por Bradford.

A quantificação da proteína do extrato foi realizada pelo método de Bradford. Resumidamente, 2,5 mL do reagente de Bradford foram adicionados a 100 µL de amostra, nas diferentes concentrações. Em seguida foi misturado suavemente e após uma incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi lida em comprimento de onda de 595 nm (espectrofotômetro Spectronic Genesys 8, Spectronic Instruments). A concentração de proteína foi estimada por meio de uma reta de regressão linear, obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA) (BRADFORD, 1976).

2.6. Eletroforese

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada segundo a técnica de Laemmli (1970) com as modificações e adaptações da técnica de Schägger e Jagow, 1987, com o intuito de melhorar a resolução das bandas, pois apresenta uma baixa concentração de proteína. Diferentes concentrações de acrilamida/bisacrilamida foram usadas, dependendo da finalidade. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo 1% de SDS, na presença ou ausência de 1% de β-mercaptoetanol e 20% de glicerol. As amostras foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g por 5 minutos a 10 °C. O azul de bromofenol foi adicionado aos sobrenadantes para permitir a visualização da corrida no gel de eletroforese. Alíquotas contendo 20 µL por poço foram aplicadas e a corrida foi realizada a uma corrente constante de 20 mA por aproximadamente 2 horas. As bandas de proteína foram visualizadas revelando-se com o “procedimento de coloração azul-prata de Coomassie”. As massas moleculares aparentes das proteínas de interesse foram estimadas a partir de uma curva construída com os Rfs dos diferentes marcadores de massa molecular utilizados (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987) (LAEMMLI, 1970) (DE MORENO; SMITH; SMITH, 1985).

2.7. Curva de tolerância à glicose.

Os animais passaram por um jejum de 12 horas. Posteriormente, os camundongos foram divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1 – Animais tratados com NaCl 0,15 M (controle hiperglicêmico);

Grupo 2 - Animais tratados com insulina (1 UI/Kg);

Grupo 3 - Animais tratados com *Mo-D3* na dose de 1 mg/kg;

Grupo 4 - Animais tratados com *Mo-D3* na dose de 5 mg/kg;

Grupo 5 - Animais tratados com *Mo-D3* na dose de 10 mg/kg;

Grupo 6 - Animais tratados com *Mo-D3* na dose de 100 mg/kg;

Grupo 7 - Animais tratados com *Mo-D3* na dose de 500 mg/kg;

Após o período de 30 minutos, todos os grupos descritos acima foram submetidos a uma carga de glicose (2 g/kg) pela via intraperitoneal, sendo então iniciada a curva glicêmica. Além desses grupos, foi também acrescentado um grupo (Grupo 8) que não foi submetido a carga de glicose, porém foi tratado com *Mo-D3* na dose de 10 mg/kg. Imediatamente após a carga de glicose, a glicemia foi medida nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 180 minutos. Todos os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.). O sangue foi coletado para determinação da glicemia pelo método da glicose oxidase (REY et al., 2020).

2.8.Teor de glicogênio.

A determinação do conteúdo de glicogênio foi feita pelo método de Krisman (1962) utilizando tecidos removidos do músculo sóleo e fígado de camundongos hiperglicêmicos tratados ou não com *Mo-D3* (5 e 10 mg/kg). Os animais foram eutanasiados imediatamente após 3 h da administração de glicose. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH 33% sob aquecimento em banho-maria a 100 °C por 20 minutos. Após isso, foi acrescentado às amostras etanol (96%), seguido de aquecimento (100 °C) e banho de gelo para que houvesse a precipitação do glicogênio. As amostras foram centrifugadas a 1300 × g por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados dissolvidos em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento das amostras com o reagente de iodo e as absorbâncias foram subsequentemente lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio por grama de tecido. As análises foram feitas em triplicata.

2.9. Teste de tolerância a insulina

Primeiramente foi necessário estabelecer um modelo experimental de resistência a insulina baseado na metodologia descrita por Mendes e colaboradores (2022). Os animais

foram divididos em cinco grupos, os quais estão descritos abaixo:

- Grupo I - animais controle que receberam solução salina;
- Grupo II - animais que receberam dexametasona (0,1 mg/kg, s.c.);
- Grupo III - animais que receberam Mo-D3 (5 mg/kg; i.p.)
- Grupo IV - animais que receberam Mo-D3 (5 mg/kg; i.p.) e, imediatamente após, dexametasona (0.1 mg/kg; s.c.);
- Grupo V - animais que receberam dexametasona (0,1 mg/kg, s.c.) e metformina (250 mg/kg; i.p.).

Os animais foram tratados por cinco (05) dias consecutivos.

Para o teste de resistência à insulina (TTI), os animais foram submetidos a um jejum de 6 horas. Então, foram feitos pequenos cortes na ponta da cauda dos animais para a realização das coletas de sangue e medida da glicemia no tempo zero do teste (0 h). Logo após, foram administrados, intraperitonealmente, 2 UI de insulina por quilograma de peso corpóreo dos animais. Posteriormente, amostras de sangue foram coletadas da cauda nos tempos de 0, 7, 14 e 28 minutos para a medida da glicemia dos animais. A constante de decaimento de glicose (Kitt) foi calculada utilizando a fórmula $0.693/t_{1/2}$, onde $t_{1/2}$ representa a glicose plasmática calculada a partir da inclinação da curva na análise dos mínimos quadrados das concentrações plasmáticas de glicose após a injeção de insulina, quando a concentração plasmática de glicose diminuiu linearmente (BONORA et al., 1989).

2.10. PCR em tempo real

Amostras do pâncreas e músculo de camundongos tratados ou não com dexametasona foram trituradas e homogeneizadas para a extração de RNA. Para isso, foi utilizado o reagente TRIzol™ (Invitrogen) e pérolas de aço para a agitação das amostras no TissueLyser LT (Qiagen). A análise do rendimento e qualidade do RNA extraído foi realizada usando leitora de microplaca Epoch™ (BioTek). A transcrição reversa de RNA foi realizada usando kits de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Applied Biosystems) e um termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems). A amplificação da PCR em tempo real foi realizada usando 2 µL de cDNA, primers específicos para cada gene e o reagente SyBR Green (Invitrogen) q.s.p. 10 µL. O método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ [20] foi usado para calcular os valores de $\Delta\Delta Ct$. A PCR em tempo real foi realizada utilizando o equipamento QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). O gene Ppia foi usado como controle interno e as sequências dos iniciadores (primers) foram as seguintes:

GLUT4: Forward: 5'-CGCGGCCTCCTATGAGATAC-3'; reverse: 5'-CCTGAGTAGGCGCCAA TGA-3'. PI3K forward 5'-CCATGACGAGAAGACGTGGA-3' e reverse 5'-GCAGCCCTGCTTACTGCTCT-3', AKT: forward 5'-GCCTGCCCTCTACAACCAG-3' e

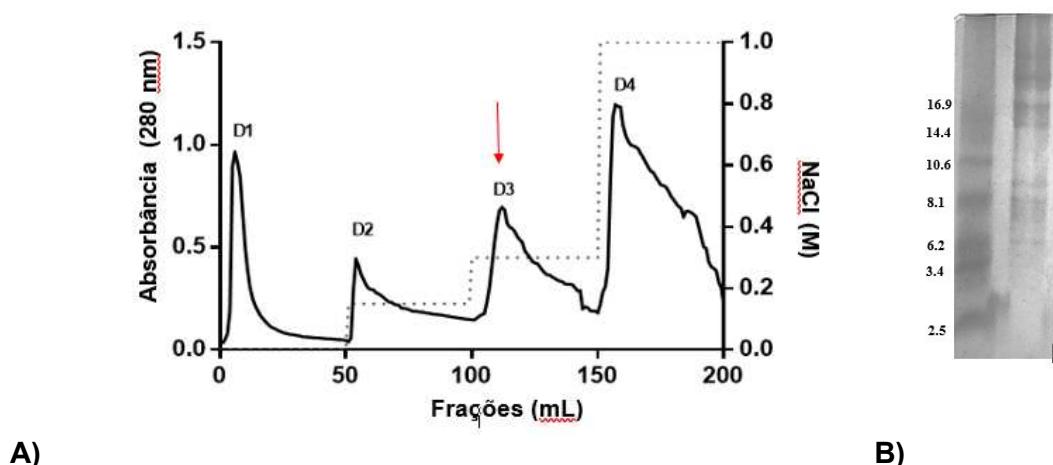
reverse 5'- TGCATGATCTCCTGGCATC-3', para as amostras de músculo. As amostras foram normalizadas usando o PPIA: forward 5'-CAGACGCCACTGTCGCTT-3' e reverse 5'- TGTCTTGAACTTGCTGGAA-3' ou YWHAZ: forward 5'-TAAATGGTCTGTCACCGT - 3' e reverse 5'-GGAAATACTCGGTAGGGTT-3'. Os resultados foram obtidos a partir da expressão média obtida a partir de cinco amostras de tecido analisadas independentemente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Obtenção de Mo-D3

O rendimento de Mo-D3 obtido a partir do extrato protéico precipitado com sulfato de amônio (0-90%), dialisado e liofilizado (Mo-LPI) foi de 8,1%. A Figura 1A mostra o perfil cromatográfico obtido após aplicação da fração proteica de folhas de *Moringa* em cromatografia de troca iônica. De acordo com Paula et al., 2017, apenas a fração Mo-D3 (D3) apresenta atividade hipoglicemiante em animais com diabetes induzida por aloxano (PAULA et al., 2017). Portanto, esta foi a fração utilizada nos testes in vivo realizados. O perfil eletroforético de Mo-D3 é mostrado na Figura 1B. Pode-se observar que a fração é composta por proteínas com massa molecular que variam, predominantemente, de 6 a 17 kDa.

Figura 1 – Cromatografia de troca iônica em matriz de DEAE-celulose (1,0 cm x 15 cm). Mo-LPI (7 mg) foi aplicada numa coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6. As frações retidas (D2, D3 e D4) foram eluídas com o mesmo tampão de equilíbrio acrescentado de NaCl 0,15 M, 0,3 M e 1,0 M, respectivamente. A seta vermelha indica a fração proteica com a atividade hipoglicemiante. (B) Eletroforese (SDS-PAGE)



3.3 Efeito de Mo-D3 na glicemia

A Tabela 1 mostra o efeito de Mo-D3 (1, 5, 10, 100 e 500 mg/kg i.p) no teste de tolerância à glicose. Como esperado, o grupo tratado com insulina apresentou a glicemia reduzida em 67%, 72% e 79% nos tempos de 15, 30 e 60 minutos, respectivamente, quando comparados ao controle hiperglicêmico. Com relação a fração Mo-D3, a dose de 1 mg/kg, não causou efeitos significativos na redução da glicemia, com exceção do tempo de 30 minutos em que foi observada uma redução de 24,4% quando comparada ao controle hiperglicêmico. Mo-D3 na dose de 5 mg/kg reduziu a glicemia em 40,9%, 39,3% e 25,6% nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Já a dose de 10 mg/kg causou reduções de 53%, 39,3% e 32,7% nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Reduções similares a esta foram observadas para a dose de 100 mg/kg, onde se observou diminuição na glicemia de 48,8%, 45,7%, e 33,2%, em 30, 60 e 180 minutos, respectivamente. Finalmente, Mo-D3 (500 mg/kg) reduziu a glicemia em 40,4%, 33,4% e 30,7% nos tempos de 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. Todos os resultados foram comparados ao grupo controle hiperglicêmico. Em relação ao grupo normoglicêmico que foi tratado com Mo-D3 na dose de 10 mg/kg foram observadas reduções na glicemia de 25%, 24% e 41% nos tempos de 30, 60 e 180 minutos, respectivamente, quando comparados ao tempo inicial (0 h).

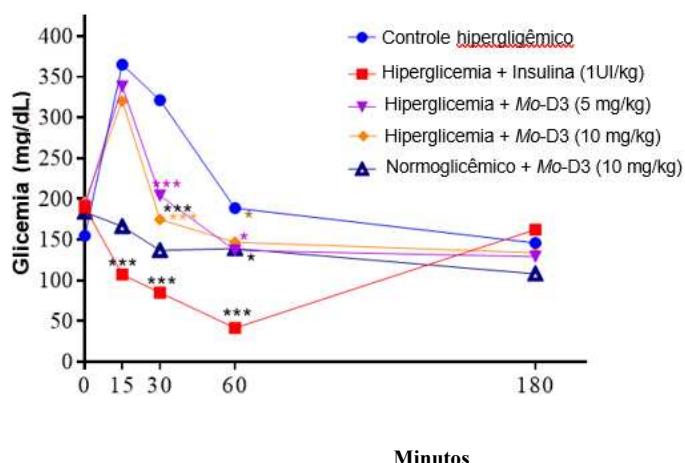
Baseado nesses resultados, pôde-se observar que todas as doses de Mo-D3 superiores a 1 mg/kg, causaram efeitos hipoglicêmicos significativos. Porém, as doses de 5 e 10 mg/kg foram as escolhidas para os próximos experimentos, já que foram as menores doses que apresentaram efeito significativo. A Figura 2 mostra a curva glicêmica dos animais tratados com Mo-D3 (5 e 10 mg/kg) e insulina.

Tabela 1 – Efeito da fração proteica Mo-D3 no teste de tolerância à glicose

GRUPO	NÍVEIS DE GLICOSE SÉRICOS (MG/ DL)				
	0 (min)	15 (min)	30 (min)	60 (min)	180 (min)
Controle hiperglicêmico	155,1±15,6 ^c	358,4 ± 13,2 ^b	345,3 ±14,8 ^a	225,3 ±14,2 ^a	173,6±12,7 ^a
Insulina (1UI/kg)	183,7±5,0 ^b	115,0 ± 6,7 ^d	96,29 ± 10,5 ^e	45,29 ± 6,5 ^d	152,9±26,0 ^a
Mo-D3 1 mg/kg	161,4±12,9 ^c	379,6 ± 14,2 ^b	261,0 ± 30,3 ^b	223,6 ± 22,1 ^a	134,3 ± 8,6 ^b
Mo-D3 5 mg/kg	191,1±7,0 ^a	338,1 ± 15,4 ^{bc}	204,1 ± 10,2 ^c	136,9± 5,6 ^{bc}	129,1 ± 4,1 ^b
Mo-D3 10 mg/kg	182,8±16,0 ^b	324,3 ± 28,6 ^c	162,3 ± 11,8 ^d	136,7 ± 9,0 ^{bc}	116,8 ± 6,1 ^b
Mo-D3 100 mg/kg	169,3±9,0 ^c	359,7 ± 20,7 ^b	176,7 ± 13,6 ^d	122,3 ± 6,1 ^c	116,0 ± 2,5 ^b

Mo-D3 500 mg/kg	220,7±14,1 ^a	422,0 ± 24,2 ^a	205,8 ± 19,1 ^c	150,0 ± 9,1 ^b	120,2 ± 9,8 ^b
Veículo + Mo-D3 5 mg/kg	152,0±9,0 ^c	136,0 ± 11,3 ^d	113,6 ± 4,8 ^e	119,1 ± 6,5 ^c	88,8 ± 5,2 ^c

Figura 2 – Efeito de Mo-D3 no teste de tolerância à glicose (TTG) em camundongos



Em resumo os resultados mostraram que Mo-D3 causou uma redução significativa da glicemia em animais hiperglicêmicos, sendo a dose de 5 e 10 mg/kg as menores doses com efeito terapêutico mais significativo em relação ao grupo controle hiperglicêmico. Em comparação com o estudo de Paula, a fração Mo-D3, teve um efeito farmacológico em uma dose 100 vezes menor quando a atividade anti-hiperglicêmica foi avaliada (PAULA et al., 2017). Entretanto, a lesão pancreática é inexistente em nosso modelo em comparação com o dano causado pela aloxana (WALDE SS et al., 2002). Por outro lado, o TTG é uma referência para estudar a homeostase da glicose e a curva de dose de novas moléculas com atividade glicêmica (BOWE et al., 2014). Atividades na redução da glicemia com extrato ou pó de folhas de *M. oleifera* também foram demonstradas em ratos Wistar com síndrome metabólica (LÓPEZ et al., 2018), ratos Sprague Dawley diabéticos (VILLARRUEL-LÓPEZ et al., 2018), diabéticos induzidos por estreptozotocina e em humanos (LEONE et al., 2018).

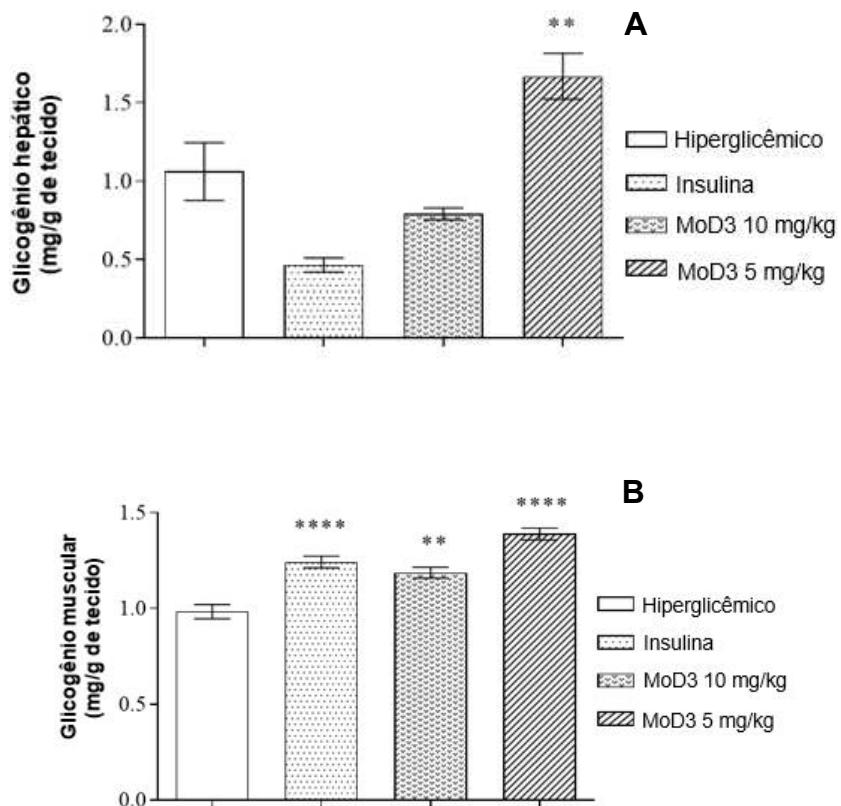
3.4. Efeito de Mo-D3 nos teores de glicogênio hepático e muscular

A Figura 3 mostra o efeito de Mo-D3 nos teores de glicogênio muscular e hepático

de camundongos após serem submetidos à carga glicêmica. Após o tratamento com Mo-D3 na dose de 5 mg/kg foi observado um aumento de 57,1% no teor de glicogênio hepático comparado ao grupo controle hiperglicêmico. Em relação ao glicogênio muscular, Mo-D3 causou um aumento de 20,5% e 41,1% nas doses de 10 mg/kg e 5 mg/kg, respectivamente, comparados ao grupo controle hiperglicêmico. O grupo tratado com insulina (1 IU/kg; i.p.) apresentou um aumento no teor de glicogênio muscular de 26,3%.

O glicogênio é um polímero de glicose hiper ramificado que funciona como reserva energética. Quando os teores de glicose aumentam, como no caso de uma carga de glicose, ocorre a liberação de insulina pelo pâncreas. Este hormônio atua, dentre outras vias, estimulando a produção de glicogênio hepático e muscular. De fato, no presente trabalho foi observado que a insulina causou um aumento no teor de glicogênio nos músculos dos animais. Entretanto, o aumento no teor de glicogênio hepático por esse hormônio não foi observado. Com relação aos animais tratados com Mo-D3, foi observado que na dose de 5 mg/kg tanto o glicogênio hepático como o muscular foram aumentados, mostrando que parte do excesso de glicose no sangue causado pela sobrecarga de glicose foi destinada para a síntese de glicogênio, reduzindo a hiperglicemia e regulando a homeostase da glicose. Outros pesquisadores que realizaram estudos do efeito de extrato das folhas de *Belamcanda chinesnsis* também encontraram um estimulador da insulina e um aumento da gliconeogênese, entretanto com uma dose de 200 mg/kg em um tratamento de 6 semanas. Estes resultados, comparados com o da nossa fração protéica de Mo-D3, indicam que nossa amostra demonstra uma maior eficiência em um curto período de tempo. Ou seja, este é o primeiro relato apontando a fração de Mo-D3 como responsável pelo aumento da quantidade de glicogênio hepático e muscular.

Figura 3. Efeito da fração proteica de Mo-D3 nos teores de glicogênio hepático (A) e muscular (B) de camundongos hiperglicêmicos. Os valores são expressos como média \pm S.E.M.; n=7 em duplicita para cada grupo. Com intervalo de significância de *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***p \leq 0,001; em relação ao grupo controle hiperglicêmico.



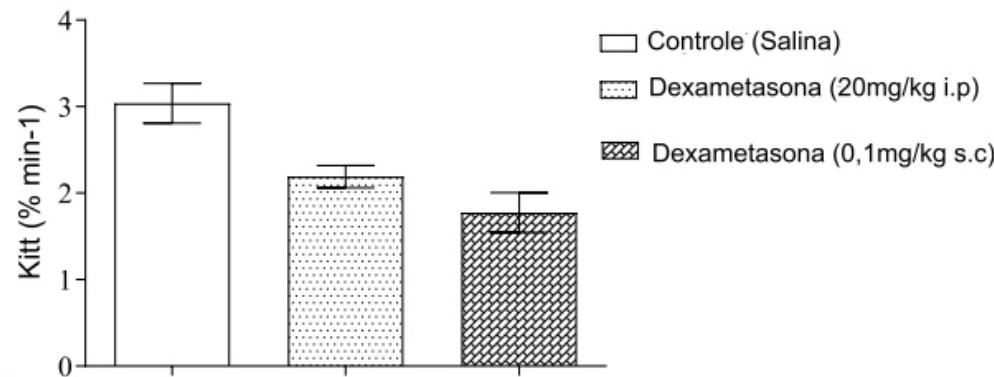
3.5 Efeito de Mo-D3 nos no teste de resistência à insulina

Para identificar se a fração proteica Mo-D3 possui algum efeito na resistência à insulina, foi realizado o teste de tolerância à insulina (ITT). Para isso, foi necessário previamente padronizar um modelo de indução de resistência à insulina através do uso de dexametasona nas doses de 20 mg/kg i.p e 0,1 mg/kg s.c, as quais causaram uma redução na sensibilidade à insulina de 28% e 42%, respectivamente. Assim, a dose de 0,1 mg/kg s.c foi selecionada para dar seguimento aos experimentos (Figura 4A). Já a dose de Mo-D3 escolhida, tendo como base o TTG, foi a de 5mg/kg i.p. A Figura 4B mostra que o grupo tratado com dexametasona teve uma redução na sensibilidade à insulina em 57% quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o tratamento com Mo-D3 aumentou a sensibilidade à insulina em 92% quando comparado ao grupo dexametasona.

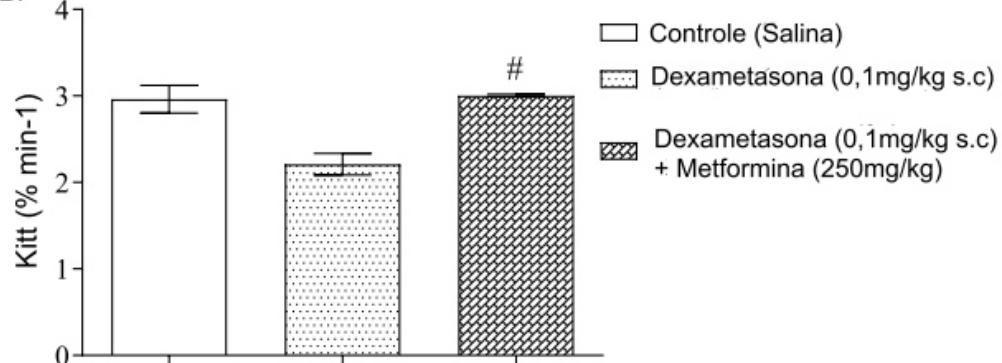
Figura 4 Efeito da dexametasona (A) e a fração proteica de Mo-D3 (C) no teste de tolerância à insulina. **P \leq 0.01, ***p \leq 0.001, comparado com o grupo controle (salina) e #p \leq 0.01 quando

comparado ao grupo dexametasona.

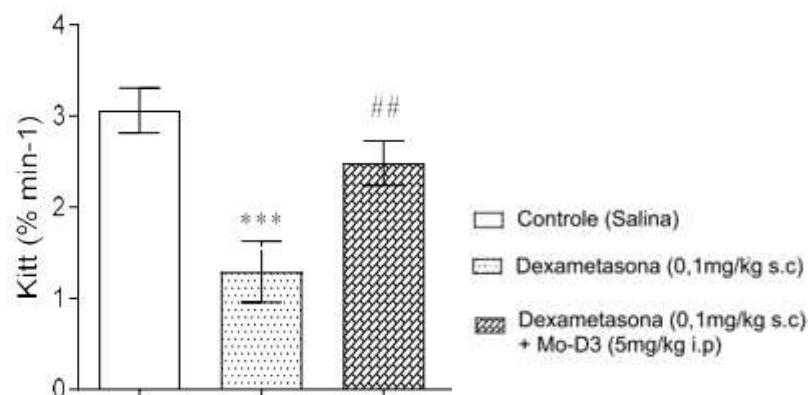
A.



B.



C.



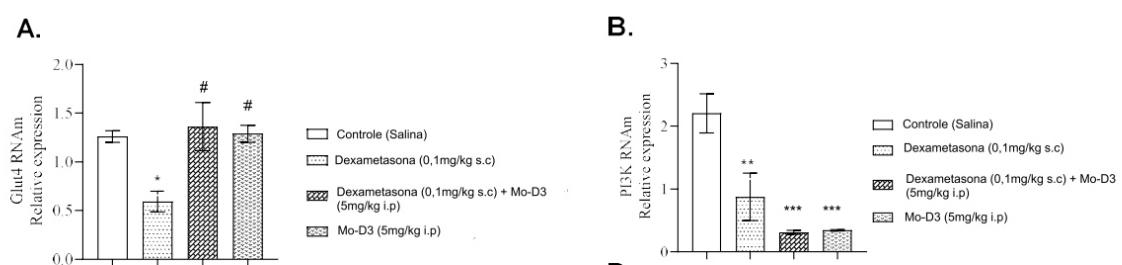
Os glicocorticoides são conhecidos por exercer efeito diabetogênico mediante a diminuição da captação de glicose nos tecidos periféricos e pela elevação da produção de glicose pelo fígado. Estes efeitos são os mesmos apresentados por pacientes que possuem resistência à insulina pré-estabelecida ou diabetes tipo 2. Assim, em nosso estudo, a indução da resistência à insulina com dexametasona foi realizada utilizando-se o protocolo descrito. e

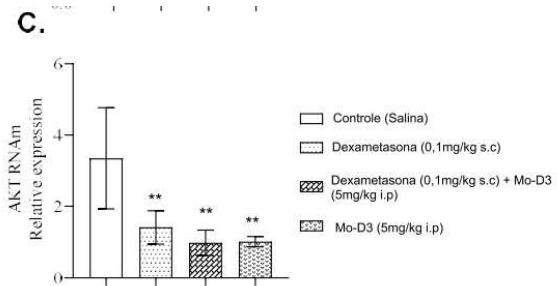
pôde-se observar que o tratamento com Mo-D3 (5 mg/kg) apresentou um excelente resultado na reversão da resistência à insulina.

3.6 Avaliação da expressão gênica

Os músculos dos animais com resistência à insulina foram avaliados quanto à expressão dos genes GLUT4, PI3K e AKT. A Figura 5A nos mostra que os animais insulino resistentes, tratados apenas com dexametasona, apresentaram uma redução no índice de expressão dos genes GLUT4 em 53% comparado ao grupo controle (salina). Por outro lado, o tratamento dos animais insulino resistentes (dexametasona) com Mo-D3 (5 mg/kg) notoriamente causou um aumento na expressão dos genes GLUT4 de aproximadamente 130% quando comparado ao grupo tratado somente com dexametasona, mostrando que Mo-D3 reverteu o efeito repressor de GLUT4 ocasionado por esse corticoide. Já o grupo de animais tratados apenas com Mo-D3 não apresentou alteração na expressão dos genes GLUT4, os quais foram mantidos em perfil de expressão semelhante ao grupo controle (salina). As Figuras 5B e 5C mostram que houve uma redução na expressão dos genes PI3K e AKT nos animais tratados apenas com dexametasona, sendo essa redução de 60% e 42% respectivamente, quando comparados aos animais controle (salina). Já o tratamento com Mo-D3 reduziu a expressão do PI3K em 64% e em 31%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle (Salina).

Figura 5. Efeito de Mo-D3, na expressão dos genes GLUT4 (A), PI3K (B), AKT (C) de músculos de camundongos resistentes à insulina induzida por dexametasona por 5 dias. Os valores são expressos na média \pm E.P.M.; n = 5. Significância para *p \leq 0.05 comparado respectivamente ao grupo controle (Salina) e #p \leq 0.05 comparado ao grupo insulino resistente.





Os dados desse experimento reforçam aqueles obtidos anteriormente relacionados ao aumento na sensibilidade à insulina. Surpreendentemente, o tratamento com Mo-D3 não causou aumento na expressão dos genes AKT e/ou PI3K, revelando que esta via não foi ativada concomitantemente com GLUT4 no músculo esquelético. Esses resultados corroboram com as pesquisas que mostram que ao se estimular o transporte, via aumento na expressão de receptores de insulina, observa-se melhorias na captação da glicose. No entanto, a baixa expressão de PI3K e AKT causada por Mo-D3 pode ser explicada pela estimulação da via alternativa da p38 MAPK, que quando fosforilada, é ativada e permite a troca de GDP por GTP na ligação à proteína Rab. Uma vez ativada, a Rab medeia a translocação vesicular da GLUT4 para a membrana plasmática e facilita a captação de glicose. Outras pesquisas mostraram que uma proteína insulino-mimética de *Costus igneus* elevou a expressão de GLUT4 [36]. Do mesmo modo, Lo e colaboradores (2016) identificaram um peptídeo de *Momordica charantia* que se liga ao receptor da insulina e aciona todo o mecanismo de sinalização para a translocar a GLUT4. Compostos de origem vegetal também podem ativar essa via, como demonstrado por Rey e colaboradores, (2020), ao estudarem o extrato aquoso de *Passiflora ligularis* Juss, que apresentou efeito hipoglicemiante. O autor descobriu que o tratamento causou a ativação das vias PI3K, MAPK e MEK/ERK, desencadeando a síntese do transportador GLUT4 e melhorando a resistência à insulina. Assim, os resultados desse trabalho sugerem que uma ou mais proteínas da fração proteica de Mo-D3 são responsáveis pela ativação da expressão de GLUT4, todavia mais investigações são necessárias para confirmar esta hipótese.

CONCLUSÃO

A fração proteica Mo-D3, obtida de folhas de *Moringa oleifera*, mostrou ser capaz de reverter a resistência à insulina, dependente do aumento da expressão de GLUT4. Além disso, promoveu efeitos sobre a regulação glicêmica e aumento na síntese de glicogênio. Todos esses resultados sugerem que essa fração apresenta potencial de ser utilizada para a continuidade dos estudos relacionados a descobertas de novos fármacos hipoglicemiantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADERINOLA TA et al. Amino acid composition, mineral profile, free radical scavenging ability, and carbohydrate inhibitory properties of *Moringa oleifera* seed globulin, hydrolysates, and membrane fractions. **J Food Biochemistry** 2022; e14131. doi:10.1111/jfbc.14131.
- ANDRADE, J, FERNANDES,D; GALVÃO, J; SILVA, D; NÓBREGA, R. Propriedades terapêuticas da *Moringa oleífera* Lam. no tratamento do diabetes mellitus. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 9, n. 7, p. 485974270, 23 maio de 2020. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i7.4270>.
- BAO Y et al. A phenolic glycoside from *Moringa oleifera* Lam. improves the carbohydrate and lipid metabolisms through AMPK in db/db mice. **Food Chemistry** 2020; 311: 125948. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125948.
- BENGAL E et al. p38 MAPK in Glucose Metabolism of Skeletal Muscle: Beneficial or Harmful? **Int J Mol Sci** 2020; 21(18): E6480. doi:10.3390/ijms21186480.
- BISHOP NC et al. Inactivity and obesity: consequences for macrophage-mediated inflammation and the development of cardiometabolic disease. **Proc Nutr Soc** 2022; 1–9. doi:10.1017/S0029665122002671.
- BONORA E et al. Estimates of in vivo insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 68(2): 374–378. doi:10.1210/jcem-68-2-374.
- BOWE JE et al. Metabolic phenotyping guidelines: assessing glucose homeostasis in rodent models. **J Endocrinol** 2014; 222(3): G13-25. doi:10.1530/JOE-14-0182.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 1976; 72: 248–254. doi:10.1006/abio.1976.9999.
- CHAUDHURY, A., DUVOOR, C., DENDI, V.R.S., KRALETI, S., CHADA, A., RAVILLA, R., MARCO, A., 2017. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for Type 2 diabetes mellitus management. **Front. Endocrinol.** (Lausanne) 24, 1–12.
- CHEN, GUI-LIN; XU, YONG-BING; WU, JIAN-LIN; LI, NA; GUO, MING-QUAN. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves and their functional chemical constituents. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 333, p. 127478, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127478>.
- CHINAZA GODSWILL AWUCHI, CHINELO KATE ECHETA, VICTORY SOMTOCHUKWU IGWE. Diabetes and the Nutrition and Diets for Its Prevention and Treatment: **A Systematic Review and Dietetic Perspective**. Health Sciences Research. Vol. 6, No. 1, 2020, pp. 5-19.
- CHOI J et al. Gelidium elegans Extract Ameliorates Type 2 Diabetes via Regulation of MAPK and PI3K/Akt Signaling. **Nutrients** 2018; 10(1): E51. doi:10.3390/nu10010051.

COSTA, I. PROTEÍNAS E PEPTÍDEOS BIOATIVOS DE VEGETAIS E SEUS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO CONTROLE GLICÊMICO. 2021. 94 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

DE MORENO MR et al. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: Increased sensitivity through a combined Coomassie blue-silver stain procedure. **Analytical Biochemistry** 1985; 151(2): 466–470. doi:10.1016/0003-2697(85)90206-4.

DYER J et al. Expression of monosaccharide transporters in intestine of diabetic humans. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2002; 282(2): G241-8. doi:10.1152/ajpgi.00310.2001.

EZZAT SM et al. Upregulation of MC4R and PPAR- α expression mediates the anti-obesity activity of *Moringa oleifera* Lam. in high-fat diet-induced obesity in rats. **J Ethnopharmacology** 2020; 251: 112541. doi:10.1016/j.jep.2020.112541.

FREDERICO MJS et al. Incretinomimetic and Insulinomimetic Effect of (2E)-N'-(1'-Naphthyl)-3,4,5-Trimethoxybenzohydrazide for Glycemic Homeostasis. **J Cell Biochem** 2016; 117(5): 1199–1209. doi:10.1002/jcb.25403.

GUO Y et al. Hypolipidemic properties of the extracts of *Belamcanda chinensis* leaves (BCLE) in KK-A_y mice. **Braz J Pharm Sci** 2022; 58. doi:10.1590/s2175-97902020000118957.

HARDIKAR MR et al. Elucidation of hypoglycemic action and toxicity studies of insulin-like protein from *Costus igneus*. **Phytochemistry** 2016; 124: 99–107. doi:10.1016/j.phytochem.2016.02.001.

HEDHILI A et al. *Moringa oleifera* Lam.: A comparative survey on consumer knowledge, usage, attitude and belief in Africa and India. **South African Journal of Botany** 2022; 147: 153–162. doi:10.1016/j.sajb.2022.01.009.

HUANG, IAN; LIM, MICHAEL ANTHONIUS; PRANATA, Raymond. Diabetes mellitus is associated with increased mortality and severity of disease in COVID-19 pneumonia – A systematic review, meta-analysis, and meta-regression. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 395-403, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.018>.

IM WALDE SS et al. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. **Life Sci** 2002; 71(14): 1681–1694. doi:10.1016/s0024-3205(02)01918-5.

JAISWAL, DOLLY; RAI, PRASHANT KUMAR; KUMAR, AMIT; MEHTA, SHIKHA; WATAL, GEETA. Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 123, n. 3, p. 392-396, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.036>.

JOSHI BN ET AL. Orally active hypoglycemic protein from *Costus igneus* N. E. Br.: an in vitro and in vivo study. **Biochem Biophys Res Commun** 2013; 436(2): 278–282. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.093.

KAUL, KIRTI; TARR, JOANNA M.; AHMAD, SHAMIM I.; KOHNER, EVA M.; CHIBBER, RAKESH. Introduction to Diabetes Mellitus. **Advances In Experimental Medicine and Biology**, [S.L.], p. 1-11, 30 dez. 2012. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-5441-0_1.

KHALID M et al. Insulin Signal Transduction Perturbations in Insulin Resistance. **Int J Mol Sci** 2021; 22(16): 8590. doi:10.3390/ijms22168590.

KHATUN, S., ISLAM, A., GULER, P., CAKILCIOGLU, U. & CHATTERJEE, N. C. (2013). Hypoglycemic activity of a dietary mushroom Pleurotus florida on alloxan induced diabetic rats. **Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma** 6 (2) 91-96 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon/issue/55883/765705>.

KRISMAN CR. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal Biochem** 1962; 4: 17–23.

KRSSAK M et al. Alterations in Postprandial Hepatic Glycogen Metabolism in Type 2 Diabetes. **Diabetes** 2004; 53(12): 3048–3056. doi:10.2337/diabetes.53.12.3048.

KUMAR, Roshan et al. A Review on Diabetes Mellitus: Type1 & Type2. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 838-850, 2020.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 1970; 227(5259): 680–685. doi:10.1038/227680a0.

LEONE A et al. Effect of *Moringa oleifera* Leaf Powder on Postprandial Blood Glucose Response: In Vivo Study on Saharawi People Living in Refugee Camps. **Nutrients** 2018; 10(10): E1494. doi:10.3390/nu10101494.

Li L et al. Crude Polysaccharide Extracted From *Moringa oleifera* Leaves Prevents Obesity in Association With Modulating Gut Microbiota in High-Fat Diet-Fed Mice. **Front Nutr** 2022; 9: 861588. doi:10.3389/fnut.2022.861588.

Lo H-Y et al. Identification of the bioactive and consensus peptide motif from *Momordica charantia* insulin receptor-binding protein. **Food Chem** 2016; 204: 298–305. doi:10.1016/j.foodchem.2016.02.135.

LÓPEZ M ET AL. Effects of *Moringa oleifera* leaf powder on metabolic syndrome induced in male Wistar rats: a preliminary study. **J Int Med Res** 2018; 46(8): 3327–3336. doi:10.1177/0300060518781726.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951 Nov;193(1):265-75. PMID: 14907713.

MAPFUMO M ET AL. Effect of crude *Moringa oleifera* Lam. seed extract on the blood markers of metabolic syndrome in high-fructose diet-fed growing Sprague-Dawley rats. **J Complement Integr Med** 2019; 17(1): /j/jcim.2019.17.issue-1/jcim-2019-0045/jcim-2019-0045.xml. doi:10.1515/jcim-2019-0045.

MARIN-PEÑALVER, J.J., MARTIN-TIMON, I., SEVILLANO-COLLANTES, C., CANÍZO-GÓMEZ, F.J., 2016. Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World J. Diabetes** 7, 354–395.

Mendes AKB et al. 1 α ,25-(OH)2 vitamin D3 prevents insulin resistance and regulates coordinated exocytosis and insulin secretion. **The Journal of Nutritional Biochemistry** 2022; 99: 108864. doi:10.1016/j.jnutbio.2021.108864.

MUKHERJEE, PULOK K.; MAITI, KUNTAL; MUKHERJEE, KAKALI; HOUGHTON, PETER J. LEADS from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 106, n. 1, p. 1-28, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2006.03.021>

NALLAMUTHU I ET AL. Comparative evaluation of *Brassica oleracea*, *Ocimum basilicum*, and *Moringa oleifera* leaf extracts on lipase inhibition and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. **J Food Biochem** 2022; 46(7): e14158. doi:10.1111/jfbc.14158.

NASSAR, MAHMOUD; DAOUD, AHMED; NSO, NSO; MEDINA, LUIS; GHERNAUTAN, VICTORIA; BHANGOO, HARANGAD; NYEIN, ANDREW; MOHAMED, MAHMOUD; ALQASSIEH, AHMED; SOLIMAN, KARIM. Diabetes Mellitus and COVID-19: review article. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 102268, nov. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2021.102268>

NAWAZ A ET AL. The importance of glycogen molecular structure for blood glucose control. **iScience** 2021; 24(1): 101953. doi:10.1016/j.isci.2020.101953.

NOVA E ET AL. Potential of *Moringa oleifera* to Improve Glucose Control for the Prevention of Diabetes and Related Metabolic Alterations: A Systematic Review of Animal and Human Studies. **Nutrients** 2020; 12(7): 2050. doi:10.3390/nu12072050.

NTARLADIMA A-M ET AL. Associations between the fast-food environment and diabetes prevalence in the Netherlands: a cross-sectional study. **The Lancet Planetary Health** 2022; 6(1): e29–e39. doi:10.1016/S2542-5196(21)00298-9.

Paula PC et al. A Protein Isolate from *Moringa oleifera* Leaves Has Hypoglycemic and Antioxidant Effects in Alloxan-Induced Diabetic Mice. **Molecules** 2017; 22(2): E271. doi:10.3390/molecules22020271.

Paula PC et al. Insulin-like plant proteins as potential innovative drugs to treat diabetes-The *Moringa oleifera* case study. **N Biotechnol** 2017; 39(Pt A): 99–109. doi:10.1016/j.nbt.2016.10.005.

PAULA, PAULO CARVALHO DE. **MORINGA OLEIFERA LAM.: UMA FONTE VEGETAL DE PROTEÍNAS HIPOGLICEMIANTES E HIPOLIPEMIANTES**. 2017. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Bioquímica, Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

RAFACHO A ET AL. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol** 2007; 85(5): 536–45. doi:10.1139/y07-037.

REY D ET AL. Cellular target of isoquercetin from Passiflora ligularis Juss for glucose L-MJHD DCBMN,-_-;MBZCX⁻XCXBNM,ptake in rat soleus muscle. **Chemico-Biological Interactions** 2020; 330: 109198. doi:10.1016/j.cbi.2020.109198.

SCHÄGGER H, VON JAGOW G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry** 1987; 166(2): 368–379. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2.

SEINO, S., SUGAWARA, K., YOKOI, N., TAKAHASHI, H., 2017. β-cell signalling and insulin secretagogues A path for improved diabetes therapy. **Diabetes Obes. Metab.** 19, 22–29

SILVA, M et al. Food safety, hypolipidemic and hypoglycemic activities, and in vivo protein quality of microalga *Scenedesmus obliquus* in Wistar rats. **Journal Of Functional Foods**, [S.L.], v. 65, p. 103711, fev. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2019.103711>.

SMITH PK ET AL. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry** 1985; 150(1): 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.

VILLARRUEL-LÓPEZ A ET AL. Effect of *Moringa oleifera* consumption on diabetic rats. **BMC Complement Altern Med** 2018; 18: 127. doi:10.1186/s12906-018-2180-2.

WANG, Fang; BAO, Yifan; ZHANG, Chen; ZHAN, Libin; KHAN, Washim; SIDDIQUA, Sahifa; AHMAD, Sayeed; CAPANOGLU, Esra; SKALICKA-WOŃIAK, Krystyna; ZOU, Liang. Bioactive components and anti-diabetic properties of *Moringa oleifera* Lam. Critical Reviews In **Food Science And Nutrition**, [S.L.], v. 62, n. 14, p. 3873-3897, 6 jan. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2020.1870099>.

WIDYAWATI, T., YUSOFF, N.A., ASMAWI, M.Z., AHMAD, M., 2015. Antihyperglycemic effect of methanol extract of *Syzygium polyanthum*(Wight.) leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. **Nutrients** 7, 7764–7780.

WONG DVT ET AL. TLR4 deficiency upregulates TLR9 expression and enhances irinotecan-related intestinal mucositis and late-onset diarrhoea. **British Journal of Pharmacology** 2021; 178(20): 4193–4209. doi:10.1111/bph.15609.