

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WYNDLY DANIEL CARDOSO GAIÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO POLAR DO EXTRATO DE PARTES
AÉREAS DE *Parkinsonia aculeata* L. SOBRE A ABSORÇÃO DE GLICOSE EM
MODELO *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

Recife
2020

WYNDLY DANIEL CARDOSO GAIÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO POLAR DO EXTRATO DE PARTES
AÉREAS DE *Parkinsonia aculeata* L. SOBRE A ABSORÇÃO DE GLICOSE EM
MODELO *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Bezerra da Silva

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- G137a Gaião, Wyndly Daniel Cardoso.
Avaliação do efeito da fração polar do extrato de partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* L. sobre a absorção de glicose em modelo in vitro de resistência insulínica / Wyndly Daniel Cardoso Gaião. – 2020.
62 f.: il.; tab; 30 cm.
- Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Diabetes mellitus tipo 2. 2. Resistência à insulina. 3. Plantas medicinais. 4. *Parkinsonia aculeata*. 5. Adipócitos 3T3-L1. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2021-002)

WYNDLY DANIEL CARDOSO GAIÃO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FRAÇÃO POLAR DO EXTRATO DE PARTES
AÉREAS DE *Parkinsonia aculeata* L. SOBRE A ABSORÇÃO DE GLICOSE EM
MODELO *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA INSULÍNICA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos.

Aprovado em 30/11/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Bernadete de Sousa Maia (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Rosali Maria Ferreira da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco
UNIBRA - Centro Universitário Brasileiro

Aos meus amados pais Josineide Gaião e Daniel Gaião, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua infinita graça e misericórdia. Nos momentos mais difíceis Ele com certeza sempre estava comigo.

Aos meus pais, **Josineide Gaião** e **Daniel Gaião**, por todo amor, carinho, dedicação, compreensão e, acima de tudo, incentivo durante a minha caminhada acadêmica.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Maria Bernadete de Sousa Maia**, pela oportunidade que me deu de ingressar na pós-graduação, pela paciência e compreensão nos momentos mais complicados da dissertação. Espero ter contribuído pelo menos um pouco ao nosso grupo de pesquisa.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. **Márcia Bezerra da Silva**, por acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu mesmo não acreditava. Obrigado pelos momentos de desabafo, sempre com uma palavra de ânimo e encorajamento.

Aos membros do Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos (LFPB): **Tamires Meira, Larissa Caroline, Laísa Wanessa, Ana Katarina, Eryvelton Franco**.

Aos membros do Laboratório de Biofísica de Membranas e Células-Tronco Dr. Oleg Krasilnicov: **Túlio Queiroga, Artur Rodrigues, Lara Marques, Jessica Meirinhos, Emmilly Mel, Maria Isabel**.

Ao Prof. Dr. **Claudio Gabriel Rodrigues** e a Prof^a. Dr^a. **Paloma Lys Medeiros**, pelo apoio, incentivo, ensinamentos e por contribuir na minha formação acadêmica.

À Prof^a. Dr^a. **Mariana Brayner**, por sempre me incluir em seus projetos e acreditar no meu potencial.

À Prof^a. Dr^a. **Liliya Yuldasheva**, pelas mensagens de apoio e ajuda durante esse ano.

Às minhas amigas **Yandilla Suellen, Jessica Santana, Deborah Fortes**, companheiras desde a graduação e com certeza para a vida toda.

À **Alélia Rosa**, pelos momentos agradáveis durante as disciplinas do PPGCF. Obrigado pela sua amizade.

À **Gisely Albertim** e **Juliana Aguiar**. Mais que amigas, irmãs que ganhei durante minha jornada acadêmica. Gratidão por tudo que ainda fazem por mim, não conseguiria chegar até aqui sem ter vocês para me inspirar e ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – **PPGCF**.

À Fundação de Amparo à Ciências e Tecnologia do Estado de Pernambuco (**FACEPE**) pela bolsa durante o período de realização deste trabalho.

"A história da ciência, como a de todas as ideias humanas, é uma história de sonhos irresponsáveis, obstáculos e erros. No entanto, a ciência é uma das poucas atividades humanas – talvez a única – em que os erros são criticados de forma sistemática e muitas vezes, ao longo do tempo, corrigidos."

(POPPER, 1972, p. 242).

RESUMO

No Brasil, uma grande variedade de espécies vegetais tem sido estudada ou utilizada pela medicina popular como terapia alternativa ou complementar para controlar as alterações verificadas na diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). *Parkinsonia aculeata* é uma espécie vegetal do bioma da Caatinga, tradicionalmente utilizada para melhorar a homeostase da glicose. O presente estudo descreve o efeito da fração polar do extrato de partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* L. sobre a absorção de glicose em modelo *in vitro* de resistência. O extrato hidroetanólico (1:1) de *P. aculeata*, sem solvente, foi submetido à partição com acetato de etila (1:1). Essa mistura foi colocada em funil de decantação para obtenção da fração polar. Posteriormente, colocou-se a fração polar em evaporador rotativo para remoção de solvente residual, seguida de congelamento e liofilização. O material obtido foi identificado como FpHEPA. Para os testes de citotoxicidade, necrose e apoptose, adipogênese e absorção da glicose, foi utilizada a linhagem celular pré-adipócitos 3T3-L1. As células foram mantidas em cultura em meio DMEM, soro fetal bovino, e antibióticos, 5% de gás carbônico a 37 °C. As células foram diferenciadas em adipócitos com 0.5 mM de 1-metil-3-isobutil-xantina (IBMX), 1 µM de dexametasona e 1 µg/mL de insulina. A avaliação da citotoxicidade da FpHEPA foi realizada pelo ensaio colorimétrico do MTT nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75 ou 100 µg/mL. A influência da FpHEPA na adipogênese foi realizada nas concentrações de 25, 50, 75 ou 100 µg/mL. Necrose e apoptose celular foram quantificadas através da citometria de fluxo. A resistência insulínica nos adipócitos foi realizada através da exposição à dexametasona (1 µM) e insulina (10 µg/ml) e a diferentes concentrações de FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 µg/mL) durante 96 horas. Os sobrenadantes referentes a cada concentração foram coletados e as concentrações de glicose determinadas pelo método da glicose oxidase. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey para diferenciação entre grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Nas concentrações testadas a FpHEPA não exibiu redução na viabilidade dos adipócitos em relação ao grupo controle. A FpHEPA aumentou a adipogênese, porém induziu aumento significativo ($p < 0,05$) na captação de glicose em todas as concentrações testadas, com destaque para a concentração de 50 µg/mL, quando comparadas ao grupo com resistência insulínica sem tratamento. Desse modo, a FpHEPA não induziu

morte celular, aumentou a adipogênese e absorção de glicose em adipócitos 3T3-L1.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2. Resistência à insulina. Plantas Medicinais. *Parkinsonia aculeata*. Adipócitos 3T3-L1.

ABSTRACT

In Brazil, a wide variety of plant species has been studied or used by popular medicine as an alternative or complementary therapy to control changes in type 2 diabetes *mellitus* (DM2). *Parkinsonia aculeata* is a plant species from the Caatinga biome, traditionally used to improve glucose homeostasis. The present study describes the effect of the polar fraction of *Parkinsonia aculeata* L. aerial part extract on glucose absorption in an in vitro resistance model. The hydroethanolic extract (1:1) of *P. aculeata*, without solvent, was subjected to partition with ethyl acetate (1:1). This mixture was placed in a separating funnel to obtain the polar fraction. Subsequently, the polar fraction was placed on a rotary evaporator to remove residual solvent, followed by freezing and lyophilization. The material obtained was identified as FpHEPA. For the cytotoxicity, necrosis and apoptosis, adipogenesis and glucose absorption tests, the pre-adipocyte cell line 3T3-L1 was used. The cells were maintained in culture in DMEM medium, fetal bovine serum, and antibiotics, 5% carbon dioxide at 37 ° C. The cells were differentiated into adipocytes with 0.5 mM 1-methyl-3-isobutyl-xanthine (IBMX), 1 µM dexamethasone and 1 µg/mL insulin. The evaluation of FpHEPA cytotoxicity was performed by the MTT colorimetric assay at concentrations of 5, 10, 25, 50, 75 or 100 µg/mL. The influence of adipogenesis FpHEPA was performed at concentrations of 25, 50, 75 or 100 µg / mL Necrosis and cell apoptosis were quantified by flow cytometry. Insulin resistance in adipocytes was achieved through exposure to dexamethasone (1 µM) and insulin (10 µg/mL) and to different concentrations of FpHEPA (25, 50, 75 or 100 µg/mL) for 96 hours. The supernatants for each concentration were collected and the glucose concentrations were determined by the glucose oxidase method. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test was used to differentiate between groups. The value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. At the concentrations tested, FpHEPA did not show a reduction in the viability of adipocytes in relation to the control group. FpHEPA increased adipogenesis, however, it induced a significant increase ($p < 0.05$) in glucose uptake in all tested concentrations, with emphasis on the concentration of 50 µg/mL, when compared to the group with insulin resistance without treatment. In this way, FpHEPA did not induce cell death, increased adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.

Keywords: Type 2 Diabetes Mellitus. Insulin resistance. Medicinal Plants. *Parkinsonia aculeata*. 3T3-L1 adipocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução da Diabetes <i>mellitus</i> no Mundo (2019-2045)	19
Figura 3 – Captação de glicose por GLUT4 via IRS/PI3K/Akt	25
Figura 2 – Partes aéreas de <i>Parkinsonia aculeata</i> L.	27
Figura 4 – Fotomicrografia da diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos	32
Figura 5 – Percentual da viabilidade dos adipócitos desafiados com FpHEPA (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 µg/mL)	33
Figura 6 – Fluorocitograma dos adipócitos desafiados com FpHEPA (50 ou 100 µg/mL)	34
Figura 7 – Efeito da FpHEPA sobre o acúmulo de gotas lipídicas nos adipócitos	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 µg/mL) sobre a absorção de glicose em adipócitos	36
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1	Diabetes <i>mellitus</i>	18
3.2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 (DM1)	19
3.3	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2)	21
3.4	Diabetes gestacional e outros tipos	22
3.5	Diagnóstico e Tratamentos da Diabetes Mellitus	23
3.6	Captação de glicose e sinalização da insulina.....	24
3.7	<i>Parkinsonia aculeata</i> L.....	25
4	METODOLOGIA	28
4.1	Material botânico	28
4.2	Obtenção do extrato hidroetanólico de <i>Parkinsonia aculeata</i> e de sua fração polar	28
4.3	Cultura e diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1	28
4.4	Avaliação da citotoxicidade da FpHEPA nos adipócitos	29
4.5	Aquisição e análise por citometria de fluxo de necrose e de apoptose nos adipócitos desafiados com FpHEPA	30
4.6	Análise da exposição dos adipócitos à FpHEPA sobre a adipogênese	30
4.7	Modelo in vitro de resistência à insulina e avaliação do efeito da FpHEPA na absorção de glicose em adipócitos	31
4.8	Análise estatística	31
5	RESULTADOS	32
5.1	Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos	32
5.2	Citotoxicidade da FpHEPA nos adipócitos	33
5.3	Análise de necrose e apoptose dos adipócitos.....	34
5.4	Efeito da FpHEPA na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos (Adipogênese).....	35
5.5	Efeito da FpHEPA na absorção de glicose em adipócitos com resistência à insulina.....	36
6	DISCUSSÃO	37

7	CONCLUSÃO.....	43
7.1	PERSPECTIVAS	44
	REFERÊNCIAS.....	45
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA TOXICOLOGY RESEARCH – QUALIS A41 INTRODUÇÃO	53
	ANEXO A – TRABALHO APRESENTADO NO XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA E XVII SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTÂNICA	62

1 INTRODUÇÃO

Para 2025 estima-se que o Brasil esteja entre os 10 países do mundo com maior número de casos de Diabetes *mellitus* (DM). A resistência à insulina caracteriza-se pelo atraso na eliminação da glicemia devido ao prejuízo na absorção de glicose por tecidos sensíveis à insulina, levando ao distúrbio da homeostase da glicose, responsável pelas complicações na Diabetes *mellitus* tipo dois (DM2) (SHOELSON et al., 2006). A regulação do transporte de glicose para o tecido adiposo, músculo esquelético e fígado é fundamental para a manutenção da homeostase da glicose no organismo (KAHN et al., 2006). Portanto, a promoção da absorção de glicose nesses tecidos é essencial para a manutenção da homeostase da glicose no manejo da resistência à insulina e diabetes (LE et al, 2017).

Produtos derivados de plantas medicinais contêm multicomponentes e podem produzir efeitos através de um modo aditivo, sinérgico e/ou competitivo multialvo (ULRICH-MERZENICH et al, 2010). Os medicamentos multialvos que afetam diferentes vias de sinalização simultaneamente são melhores para combater doenças complexas e multigenéticas e são menos propensos a mecanismos de resistência à drogas (EFFERTH; KOCH, 2011). Pesquisas que oportunizem inovações terapêuticas a partir de plantas medicinais para o tratamento/controle de distúrbios metabólicos provocados pela DM devam ser incentivadas. Nesse contexto, a pesquisa de produtos naturais que minimizem transtornos associados à diabetes, como a hiperglicemia e dislipidemia, vem recebendo atenção especial.

Parkinsonia aculeata é um vegetal do bioma da caatinga tradicionalmente utilizada para melhorar a homeostase da glicose. Estudos *in vivo* demonstram que o extrato hidroetanólico das partes aéreas da *P. aculeata* particionado com acetato de etila (EHPAc) promoveu significativa melhora da resistência à insulina induzida por dieta em um modelo murino de obesidade. (ARAUJO et al., 2016a). Nossos estudos de bioprospecção, utilizando métodos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, mostraram que a FpHEPA melhora a resistência à insulina em camundongos e ratos obesos (redução na glicemia, insulinemia e leptinemia de jejum e no índice de HOMA-IR) (ARAUJO et al., 2016a).

Estudos de bioprospecção também evidenciaram que o extrato aquoso (LEITE et al., 2007) e hidroetanólico (LEITE et al., 2011) de *P. aculeata* desencadeia vários efeitos benéficos em parâmetros bioquímicos e fisiológicos relacionados ao

metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios, em modelo experimental de diabetes induzido quimicamente.

Diante desse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da fração polar do extrato de partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* L. (FpHEPA) sobre a viabilidade celular, adipogênese e consumo de glicose por adipócitos com resistência insulínica induzida pela dexametasona.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da fração polar do extrato de partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* sobre a absorção de glicose em modelo *in vitro* de resistência insulínica.

2.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroetanólico (HEPA) das partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* e de sua fração polar (FpHEPA)
- Cultivar e induzir à diferenciação de pré-adipócitos da linhagem 3T3-L1 em adipócitos;
- Determina a citotoxicidade da FpHEPA nos adipócitos;
- Avaliar o efeito da FpHEPA sobre a necrose e apoptose nos adipócitos;
- Avaliar o efeito da FpHEPA sobre a adipogênese;
- Induzir resistência à insulina nos adipócitos;
- Determinar o efeito da FpHEPA sobre a absorção de glicose por adipócitos.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Diabetes *mellitus*

A DM faz parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na secreção de insulina, ação da insulina ou ambos (KHARROUBI; DARWISH, 2015). Anormalidades metabólicas em carboidratos, lipídios e proteínas demonstram a importância da insulina como um hormônio anabólico (NZARO; NJAGI, 2014). Baixos níveis de insulina para alcançar resposta adequada e/ou resistência à insulina dos tecidos-alvo, principalmente músculos esqueléticos, adiposo tecido e, em menor grau, fígado, ao nível da receptores de insulina, são responsáveis por essas anormalidades metabólicas (HONKA et al., 2018).

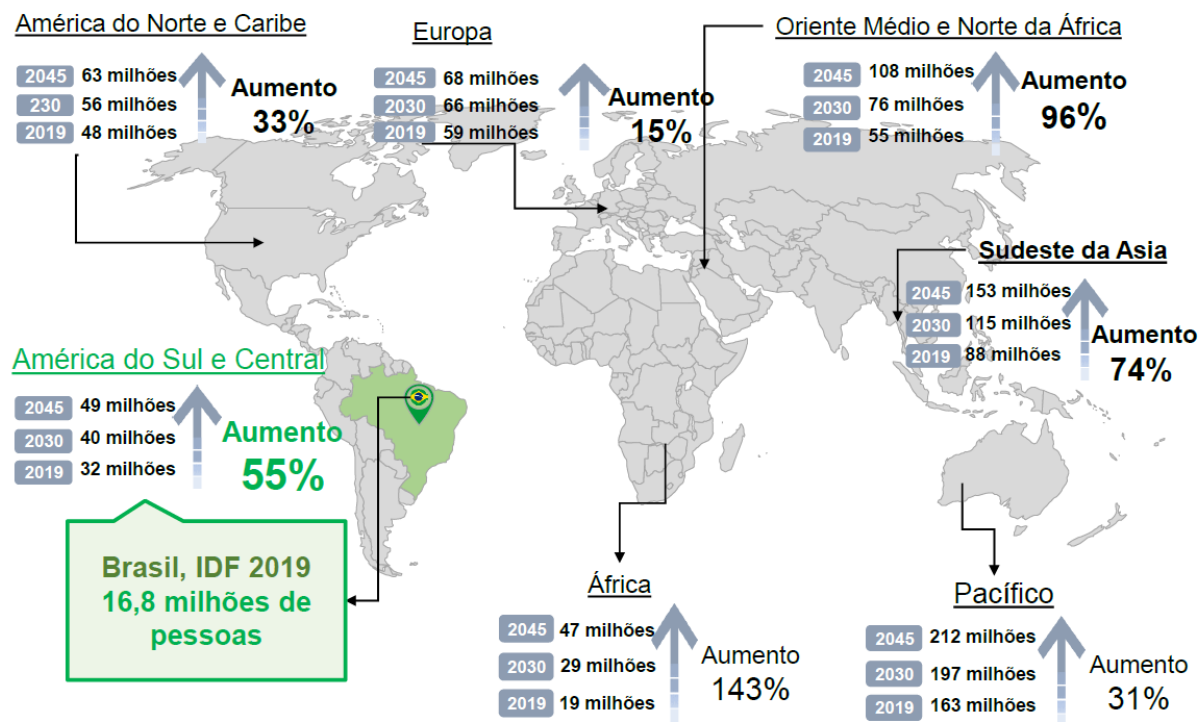
A DM não é mais um termo estranho para a população global, pois é cada vez mais prevalente em todos os países independentemente do nível de renda (FOROUHI; WAREHAM, 2014). Por outro lado, aproximadamente uma em cada duas pessoas com diabetes não sabe que tem a doença (ENGLISH; LENTERS-WESTRA, 2018).

A Federação Internacional de Diabetes (FID) estimou que o número de casos de diabetes aumente de 285 milhões de pessoas em 2009 para 438 milhões em todo o mundo em 2030 (BENNETT, 2018; CAO et al., 2018; ZHAO et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) foram diagnosticadas cerca de 422 milhões de pessoas em todo o mundo com diabetes em 2014 (VINAYAGAM; XIAO; XU, 2017). Outros dados recentes estimaram que 629 milhões de pessoas sofrerão de DM até o ano 2045 (ENGLISH; LENTERS-WESTRA, 2018) (Figura 1). O Brasil é o quarto país com mais casos de diabetes no mundo, segundo a FID. Dados do Ministério da Saúde informam que são 12,2 milhões de pessoas, cerca de 7% da população nacional acometidas com a doença.

É importante que todas as formas de diabetes sejam diagnosticadas na fase inicial para prevenir ou retardar complicações em alguns órgãos e causar, por exemplo, nefropatia diabética, retinopatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e úlcera diabética (Forouhi; Wareham, 2014). Outras complicações graves, como cegueira, atraso na cicatrização de feridas, disfunção erétil, cardiopatia isquêmica e complicações micro e macrovasculares (KAHN et al., 2014).

A DM é um fardo socioeconômico considerável para muitos países. Inovações científicas desempenham um papel vital na descoberta de novas alternativas terapêuticas (WU et al., 2014).

Figura 1 – Evolução da Diabetes *mellitus* no Mundo (2019-2045).



Fonte: Adaptado da Federação Internacional de Diabetes

3. 2 Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1)

Esse tipo de diabetes constitui 5% a 10% dos indivíduos diagnosticados com DM. A DM1 é responsável por 80% a 90% do diabetes em crianças e adolescentes (DABELEA et al., 2009). De com a FID, o número de jovens diagnosticados com DM1 com idade entre zero e quatorze em todo o mundo em 2013 foi de 497.100 e o número de casos registrados foi de 789.000. Esses números não representam o número total de pacientes com DM1 devido à alta prevalência na adolescência e em adultos acima de 14 anos de idade. Uma estimativa feita nos Estados Unidos em 2010 foi de 3 milhões de pessoas com DM1 (CHIANG et al., 2014). A prevalência da DM1 no mundo não é conhecida.

A principal causa da DM1 é a destruição auto-imune das células- β pancreáticas através da resposta inflamatória mediada por células T bem como uma resposta humoral (célula B). Esse processo é chamado de insulite (PIROT et al., 2008). A presença de autoanticorpos contra as células das ilhotas pancreáticas é a marca registrada da DM1, embora o papel desses anticorpos na patogênese da doença não seja claro (BURRACK; MARTINOV; FIFE, 2017). Esses autoanticorpos incluem auto-anticorpos para células de ilhotas e auto-anticorpos para insulina (IAA), descarboxilase do ácido glutâmico (GAD, GAD65), proteína tirosina fosfatase (IA2 e IA2 β) e proteína transportadora de zinco (ZnT8A) (WENZLAU; HUTTON, 2014). Esses autoanticorpos pancreáticos são características da DM1 e podem ser detectados no soro desses pacientes meses ou anos antes do início da doença (SHIVAPRASAD et al., 2014).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (AAD), este tipo de diabetes é caracterizado principalmente pela ausência da secreção de insulina. Além da importância da predisposição genética na DM1, vários fatores ambientais foram implicados na etiologia da doença (CORRÊA-GIANNELLA; VIEIRA; 2008). Estudos recentes reforçam o efeito causador de infecções virais na DM1 (TONIOLO et al., 2019). Os fatores virais incluem: infecções por rubéola, infecção viral por enterovírus, rotavírus, vírus do herpes, citomegalovírus, retrovírus endógeno e vírus Ljungan (BOLIS et al., 2016). Baixos níveis de vitamina D podem desenvolver mecanismos que predisponem a DM1 (GRAMMATIKI et al., 2017).

A DM1 geralmente se desenvolve repentinamente e pode produzir sintomas como: polidipsia, poliúria, enurese, falta de energia, cansaço extremo, polifagia, perda súbita de peso, feridas de cicatrização lenta, infecções recorrentes, visão turva com desidratação grave e cetoacidose diabética em crianças e adolescentes (KHARROUBI; DARWISH, 2015). Os sintomas são mais graves em crianças em comparação ao adulto. Esses pacientes com DM1 também são propensos a outros distúrbios auto-imunes, como: tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, vitiligo, canal celíaco, hepatite auto-imune, miastenia grave e anemia perniciosa (COJOCARU; COJOCARU; SILOSI; 2010).

3. 3 Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2)

A diabetes *mellitus* do tipo 2 (DM2) é classificada como uma Doença Crônica não Transmissível (DCNT), caracterizada por distúrbios metabólicos e bioquímicos, marcado por uma condição hiperglicêmica crônica, causada por uma deficiência da sinalização da insulina e de etiologia não autoimune (HAMEED et al., 2015).

A resistência à insulina é uma característica importante no desenvolvimento e fisiopatologia da DM2 (CERSOSIMO et al., 2018). Em indivíduos saudáveis, o músculo esquelético é responsável pela maior parte da captação da glicose durante a hiperinsulinemia (cerca de 75-80%), considerando que a proporção de captação nos tecidos adiposo hepático é menor (ALVIM et al., 2015; HONKA et al., 2018). Indivíduos com peso normal e tolerância normal à glicose são altamente sensíveis à insulina no músculo esquelético, tecido adiposo e fígado, em comparação com indivíduos obesos e com DM2 (CASTRO et al., 2014). A sensibilidade à insulina varia com a ingestão de alimentos ricos em carboidratos e gorduras, realização de atividade física e sinais de estresse (BIRD; HAWLEY, 2015). A DM, a hipertensão e a dislipidemia associada à obesidade constituem o conjunto de anormalidades que formam o quadro conhecido por síndrome metabólica (SM) (CORNIER et al., 2008). Indivíduos obesos têm mais tecido adiposo, que liberam hormônios e outras substâncias que podem aumentar a flutuação da sensibilidade à insulina (HUANG, 2009).

Em condições fisiológicas normais, a insulina controla a homeostase da glicose no sangue dentro de um intervalo estreito através da estimulação da captação de glicose nos tecidos periféricos, suprimindo a liberação de lipídios armazenados no tecido adiposo e hepático (SHARABI et al., 2015). Na DM2 esse mecanismo é interrompido quando a secreção de insulina é prejudicada pela disfunção das células β -pancreáticas e comprometida a ação da insulina através da resistência à insulina.

A circulação de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em indivíduos obesos também está associada à resistência à insulina. Um ambiente rico em ácidos graxos com condições hiperglicêmicas pode levar à redução da expressão do gene da insulina (MUKHERJEE et al., 2013). Além disso, os ácidos graxos podem potencializar a toxicidade, ativando diretamente vias inflamatórias, pois o tecido adiposo é crucial na produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , MCP-1, IL-6, IL-1 e PAI-1 (ROCHA et al., 2017). Por exemplo, TNF- α atua como citocina pró-inflamatória que medeia a resistência à insulina através do aumento da fosforilação na região serina

do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1). Além disso, o TNF- α inicia as vias de sinalização c-Jun NH2-cinase terminal (JNK) e fator nuclear-kB (NF-kB). Ambas as vias induzirão a fosforilação do resíduo de serina Ser 307 do IRS-1, causando resistência à insulina. Eles aumentam citocinas inflamatórias e células imunes, que consequentemente resultam em inflamação das ilhotas no pâncreas da DM2 em modelo *in vivo* (BOUCHER; KLEINRIDDERS; KAHN; 2014).

Os lipídios também afetam a sensibilidade à insulina, aumentando o acúmulo de diacilgliceróis intracelulares, um produto de triacilglicerol que tem um impacto negativo na sinalização da insulina. Além disso, os lipídios aumentam a quantidade da proteína quinase C, que desempenham um papel principal na inibição da transdução da sinalização de insulina (KOJTA; CHACINSKA; BŁACHNIO-ZABIELSKA; 2020). Os ácidos graxos saturados (SFAs) ativam o receptor Toll-like 4 (TLR4), que por sua vez media a inflamação associada à resistência à insulina, regulando positivamente a expressão da I κ B quinase (IKK), fatores de transcrição NF-kB e mediadores pró-inflamatórios nos macrófagos do tecido adiposo (ROGERO; CALDER; 2018).

3.4 Diabetes gestacional e outros tipos

A Diabetes *mellitus* Gestacional (DMG) é definida como hiperglicemia de gravidade variável no início ou diagnóstico durante a gravidez, resultante de qualquer nível de intolerância aos carboidratos. Sua incidência pode variar entre 3% a 7%, dependendo da população estudada e dos critérios de diagnósticos adotados (MIRANDA; REIS; 2006). Fatores de risco para DMG inclui obesidade, história pessoal de gestação diabetes, história familiar de diabetes, idade materna, síndrome do ovário policístico, vida sedentária e exposição a fatores tóxicos (GALTIER, 2010).

Os outros tipos específicos de DM são formas mais incomuns de DM que possuem apresentação clínica bastante variada e dependente da alteração de base associada. Dentre as alterações possíveis, pode haver defeito genético na função das células beta, doenças do pâncreas exócrino, defeitos genéticos na ação da insulina, efeito adverso de medicamentos (BAYNEST, 2015).

3.5 Diagnóstico e Tratamentos da Diabetes *mellitus*

Segunda a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o diagnóstico da DM acaba se tornando difícil quando se considera que os sintomas clássicos da doença (poliúria, polidipsia e polifagia) não estão presentes na maioria dos casos de DM2. Portanto, o diagnóstico da DM2 e do pré-diabetes só poderá ser confirmado através de testes laboratoriais de glicemia e de hemoglobina glicada (A1C). Os critérios para diagnóstico da DM e pré-diabetes estão listados abaixo:

Critérios para o diagnóstico de diabetes

- A1C $\geq 6,5\%$;
- Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL;
- Glicemia pós-prandial de duas horas ≥ 200 mg/dL no teste de tolerância à glicose;
- Glicemia ao acaso (em qualquer horário) ≥ 200 mg/dL em pacientes sintomáticos (poliúria, polidipsia e perda de peso);

Critérios para o diagnóstico de pré-diabetes

- A1C entre 5,7% e 6,4%;
- Glicemia de jejum entre 100-125 mg/dL;
- Glicemia pós-prandial de 2 horas entre 140 e 199 mg/dL, no teste oral de sobrecarga à glicose;

Em pacientes com DM1, a administração de insulina exógena é a terapia principal. A insulina é o mais potente redutor da glicemia disponível, e isto explica o alto risco de hipoglicemia associado ao tratamento com a mesma (BASTAKI, 2005). Neste tipo de tratamento, a administração de insulina pode ser feita em múltiplas doses, com o uso de seringas, canetas ou sistema de infusão contínua. Em pacientes com DM2, devem ser consideradas, além do controle glicêmico, outras medidas não farmacológicas, como: a adoção de prática regular de atividade física, alimentação balanceada, hábitos de vida saudáveis, cessação do tabagismo e moderação no uso de álcool (MARÍN-PEÑALVER et al., 2016). Esses quesitos são fundamentais não só para o controle da glicemia, mas também para o controle de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. O tratamento farmacológico do DM2 inclui anti-hiperglicemiantes (orais ou injetáveis) e insulina. Os antidiabéticos não insulina administrados por via oral incluem fármacos das seguintes classes: biguanidas, sulfoniluréias, glitazonas, inibidores da alfa-glicosidase, análogos de GLP-1, inibidores de SGLT-2 e inibidores da DPP-IV (CHAUDHURY et al., 2017).

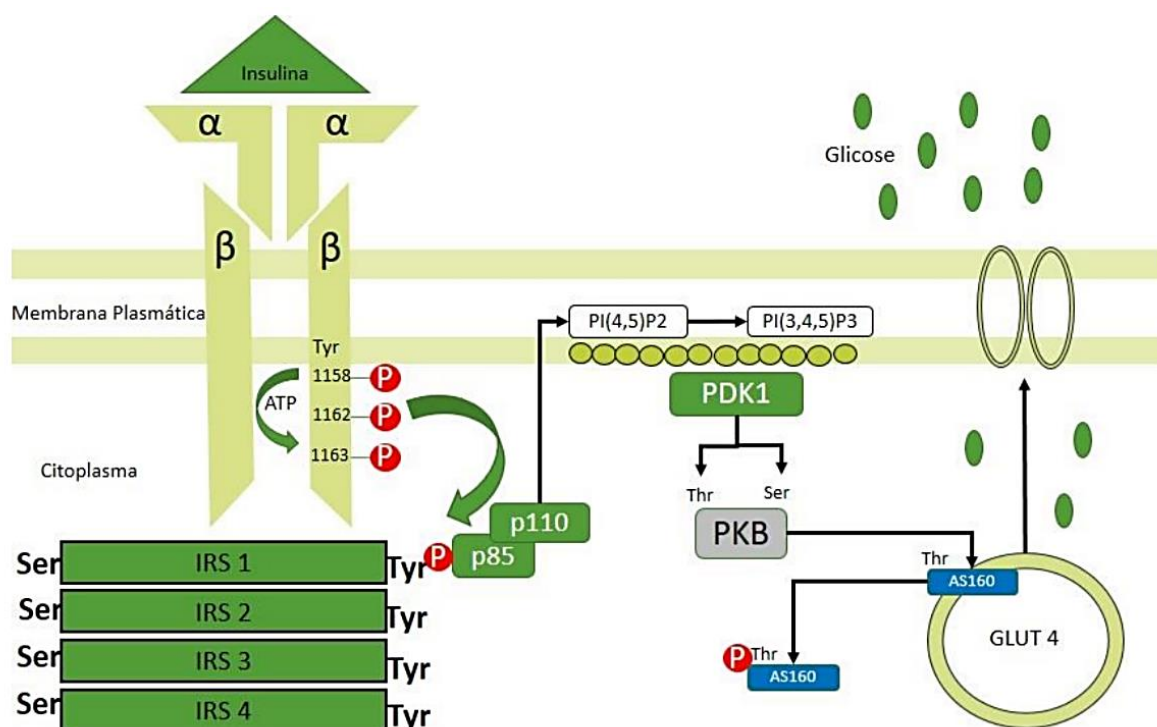
3.6 Captação de glicose e sinalização da insulina

Todos os tecidos são capazes de captar e utilizar a glicose como fonte de energia de acordo com a demanda metabólica local (SMITH et al., 2018). Durante o período pós-prandial, o principal hormônio responsável por aumentar a captação de glicose em tecidos do organismo é a insulina. Esse hormônio promove o armazenamento da glicose, sob a forma de glicogênio e de triglicérides, pelo fígado, músculo estriado e tecido adiposo (WILCOX, 2005). Para que a glicose seja captada pela célula, é necessário que transportadores estejam presentes em sua membrana plasmática (MP) (HUANG; CZECH; 2007). Uma família de transportadores de glicose (GLUT), têm sido alvo de muitos estudos nas últimas décadas. Dentre os 14 GLUTs descritos na literatura (GOVERS et al., 2014), tem-se dado atenção especial ao GLUT4. Esse transportador é expresso principalmente no músculo estriado e tecido adiposo, onde sua translocação e inserção na MP são reguladas principalmente pela insulina. Sabe-se que defeito nas vias de sinalização desse hormônio pode causar resistência insulínica e levar ao DM2 (CHADT; AL-HASANI; 2020). O transporte de glicose através dos GLUTs ocorre por difusão facilitada, em função do gradiente de concentração e sem gasto de energia. Após a glicose entrar na célula, ela é fosforilada pela enzima hexocinase, o que impede sua saída pelos GLUTs e permite que ela seja metabolizada pela via glicolítica, bem como armazenada sob a forma de glicogênio ou triglicérides (JENSEN et al., 2011).

A insulina inicia sua ação pela interação com seu receptor de membrana, o receptor de insulina (IR) (Figura 2). Este é um heterotetrâmero formado por duas subunidades α e duas β , sendo que as α se localizam na parte extracelular e as β , ligadas às α , estão inseridas na MP e apresentam uma terminação citoplasmática com atividade tirosina cinase (FONTENELLE et al., 2018). Quando a insulina se liga às subunidades α , ocorre ativação da tirosina cinase e autofosforilação nos resíduos de tirosina das caudas citoplasmáticas das subunidades β , o que aumenta ainda mais a atividade cinase do IR (VIRKAMÄKI; UEKI; KAHN; 1999). Em seguida ocorre fosforilação de substratos do receptor de insulina (IRS) com consequente ativação da subunidade regulatória p85 da enzima fosfatidilinositol-3'-cinase (PI3K). A p85 recruta e ativa sua subunidade catalítica p110 próxima à MP, onde ocorre a produção de 18 fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3) a partir de fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfato (PIP2), que, por sua vez, ativa a proteína cinase dependente de fosfoinosítido

(PDK1) e a Akt (também chamada PKB). A PDK-1 juntamente com a complexo protéico mTORC2 ativam completamente a Akt, que fosforila e inativa seu substrato de 160 KDa (AS160 ou TBC1D4), gerando acúmulo de Rab-GTP e essa cascata de sinalização direciona a translocação do GLUT4 para a MP com aumento na absorção de glicose (STÖCKLI et al., 2008).

Figura 2 – Captação de glicose por GLUT4 via IRS/PI3K/Akt.



Fonte: Salles et al., 2019.

3.7 *Parkinsonia aculeata* L.

Diversas espécies vegetais vêm sendo citadas na literatura como adjuvantes no tratamento da *Diabetes mellitus* atuando, tanto no tratamento da doença em si como atenuando seus sintomas e possíveis consequências. Inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de comprovar o efeito de espécies vegetais, muitas vezes utilizadas apenas com base em dados empíricos. A DM por ser uma doença crônica, de tratamento contínuo, é alvo interessante para a busca de novos métodos de tratamento com a possibilidade de uso de várias espécies de plantas medicinais para o tratamento, contribuindo para triagens etnofarmacológicas e direcionamento

de pesquisas que relacionem o potencial de espécies brasileiras para o tratamento desta condição patológica (CECÍLIO et al., 2008).

Parkinsonia aculeata L. é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae. As espécies da subfamília Caesalpinioideae são arbustos, árvores e raramente ervas, encontrados em regiões tropicais e inclui 56 gêneros e aproximadamente 650 espécies (SHARMA et al, 2018). *Parkinsonia aculeata*, popularmente conhecida como espinho de Jerusalém, talo verde mexicano ou turco, é uma árvore perene, de florescência, nativa da América do Norte e do Sul, usada como uma planta ornamental em climas tropicais e subtropicais e tem sido utilizada para revegetar regiões desertificadas em toda a região pantrópica (KLINKEN et al. 2008).

Essa espécie varia de tamanho, entre 4 e 10 metros de altura e de 1 a 2 metros de altura do fuste (Figura 3). Pode ser arbusto, arvoreta ou árvore com caule castanho escuro a esverdeado nos ramos mais altos e com espinhos rígidos. Folhas alternas, uni a bijulgadas, com raque muito encurtada. Cada pina é formada por raque aplanada, com folíolos pequenos, afastados entre si. Corola com 4 pétalas amarelas, iguais, e uma superior, amarela, com manchas vermelhas na base, passando no amadurecimento a vermelho alaranjado, estames com anteras de cor castanho. Fruto legume ou sublegume, não deiscente, com ápice bem agudo, com constrições entre as sementes (FABRICANTE, 2010).

Extratos orgânicos dos frutos, caule e folhas dessa planta são usados na medicina popular para tratar várias doenças. Folhas e flores são usadas para tratar reumatismo (DIVYA et al., 2011). Foi relatado também o seu uso como antipirético (MRIDHA et al., 2010; GUPTA et al., 2011; MARZOUK et al., 2013), analgésico ou anti-inflamatório (HUNDEKARI et al., 2012), atividade hepatoprotetora (SHAH; DEVAL, 2011), antimicrobiano e antibacteriana (Kamba e Hassan, 2010; Al-Youssef e Hassan, 2015), amebicida (KAMAL; MATHUR, 2007), tripanocida e atividades antidiabéticas (LEITE et al., 2007, 2011; HUNDEKARI et al., 2013). O extrato hidroalcolólico da *Parkinsonia aculeata* também possui ação antioxidante (MRUTHUNJAYA; HUKKERI, 2008), antiparkinson (PATEL et al., 2014).

No Brasil, *Parkinsonia aculeata* é encontrada na região do Xingó, região do semiárido Nordeste entre os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Sergipe, reconhecida pela população local como uma planta antidiabética (ALMEIDA et al., 2005). De acordo com informações de comunidades locais, tradicionalmente é

preparada como infusão das partes aéreas da planta, aproximadamente 15 gramas por litro, e consumida durante o dia para tratar complicações relacionadas ao diabetes (LEITE et al, 2011).

Foi relatado que as folhas de *Parkinsonia aculeata* L. contêm C-glicosilflavonas como isoorientina, vitexina e isovitexina (HASSAN et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2020). Outros constituintes relatados nas folhas são C-glicosídeos, Epi-orientina, C-glicosídeo de luteolina, Parkinsonin-A (BHATIA et al., 1961). Alguns outros compostos fitoquímicos como a leucina-II, vicianina-II, diosmetina 6-C- β -glucósido, apigenina, luteolina, kaempferol e crisosseriol do extrato da folha desta planta formam também relatados (El-SAYED et al, 1991). Ali et al., 2005 isolaram uma nova flavanona chamada Parkintin do extrato hidrometanólico das folhas da *P. aculeata*.

FIGURA 3 – Partes aéreas de *Parkinsonia aculeata* L.



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/206602701628031070/>. Acesso em 20 de setembro de 2020.

4 METODOLOGIA

4.1 Material botânico

O material botânico (partes aéreas de *Parkinsonia aculeata*) foi coletado na região de Xingó, (semiárido nordestino entre os estados de Alagoas, Bahia, Pernambuco e Sergipe). A espécie vegetal foi devidamente identificada e um espécime voucher se encontra depositado (nº 500) no Herbário do Xingó (Canindé do São Francisco, Sergipe, região Nordeste, Brasil).

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico de *Parkinsonia aculeata* e de sua fração polar

As partes aéreas da *Parkinsonia aculeata* foram secas em estufa de circulação forçada a 50°C e pulverizadas em moinho de facas. O extrato hidroetanólico de *P. aculeata* (HEPA) foi obtido a partir da maceração das partes aéreas (500 g) do vegetal em EtOH:H₂O (1:1, v/v) sob agitação mecânica por 48 h a 23 °C e, em seguida, filtrado em papel de filtro qualitativo. O material filtrado foi submetido ao processo de extração do solvente em evaporador rotativo (TECNAL, modelo TE-211). Em seguida, o material foi particionado em funil de separação adicionando acetato de etila (1:1) para a obtenção da fração polar. A fração polar obtida foi submetida ao processo de evaporação rotativa para remoção de solvente residual, congelada (-20°C) e posteriormente submetida a liofilização (LIOTOP, modelo L-101). O material liofilizado foi reidratado em água (100 mL) e subsequentemente submetido à decantação com etanol PA (250 mL de etanol para cada 5 g de material) e deixado em repouso por 24 horas. Na sequência o sobrenadante foi coletado, evaporado, congelado e liofilizado. O material obtido foi identificado como fração polar obtida do extrato hidroetanólico de *P. aculeata* (FpHEPA). Para os ensaios *in vitro*, a FpHEPA foi diluída em água deionizada (veículo) no dia do experimento.

4.3 Cultura e diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1

A linhagem celular 3T3-L1 foi adquirida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich. As células foram mantidas em cultura conforme descrito na literatura (ZEBISCH, et al. 2012) em garrafas de cultura estéreis (25 e 75 cm²), com meio de cultura modificado

por Dulbecco (DMEM; Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®), e os antibióticos penicilina e estreptomicina (100 U/mL e 100 µg/mL, respectivamente; Gibco®), sob uma atmosfera de 5% de gás carbônico (CO₂) a uma temperatura de 37°C. As células foram mantidas nessas condições até atingirem a confluência de aproximadamente 80%.

Para o processo de diferenciação, as células permaneceram três dias em meio DMEM contendo 10% de SFB, 0.5 mM de 1-metil-3-isobutil-xantina (IBMX), 1 µM de dexametasona e 1 µg/mL de insulina (Sigma Aldrich, USA). Após esse período, as células foram mantidas por mais sete dias em meio DMEM contendo 10% de SFB e 10 µg/mL de insulina. As etapas e comprovação da diferenciação celular foram observadas microscopicamente e as fotomicrografias foram adquiridas por uma câmera (MOTICAN2000, MOTIC, BR) acoplada a um microscópio invertido (LEICA, DM IL, USA).

4.4 Avaliação da citotoxicidade da FpHEPA nos adipócitos

A análise da viabilidade celular foi baseada na atividade mitocondrial das células através da técnica colorimétrica do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (MOSMANN, 1983). Os adipócitos em meio de cultura foram cultivados em placas de 96 poços (1×10³ células/poço) e desafiados com a FpHEPA (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 µg/mL). Como controle negativo foi adicionado água deionizada (10 µL). Após 96 h de incubação, 20 µL do corante MTT (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e incubados por 4 h (37 °C, 5% CO₂). Em seguida, o meio de cultura foi completamente removido e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar os cristais de formazan (sal de coloração azul resultante da reação de redução do MTT pela desidrogenase mitocondrial). A densidade óptica da solução resultante foi lida no leitor automático de placa (Varioskan Flash, Thermo Scientific), no comprimento de onda de 595 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores médios de densidade óptica obtidos a partir de células expostas a água deionizada foram usados como uma referência de controle negativo (100% de viabilidade celular).

4.5. Aquisição e análise por citometria de fluxo de necrose e de apoptose nos adipócitos desafiados com FpHEPA

A apoptose celular foi quantificada usando o sistema comercial AnnV-FITC; enquanto a necrose foi quantificada por Iodeto de Propídio (PI) (Invitrogen). Os adipócitos ($1,0 \times 10^5$ células por poço) foram expostos a FpHEPA (50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) por 96 horas. Após esse período, as células foram tripsinizadas, lavadas três vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação. Em seguida, foi adicionada uma solução de anexina V-FITC (1: 500) e PI (20 $\mu\text{g/mL}$) para marcar as células antes da análise por citometria de fluxo (BD Accuri C6). Para cada amostra, 10.000 eventos foram analisados e os resultados foram analisados no software BD Accuri C6. De acordo com o fabricante, as células AnnV-/PI+ apresentam características necróticas e as células AnnV+/PI- são consideradas no estágio inicial da apoptose. As células duplas negativas são consideradas viáveis.

4.6 Análise da exposição dos adipócitos à FpHEPA sobre a adipogênese

Para indução da adipogênese, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram semeados em placas de cultura de seis poços (5×10^4 células/poço) e mantidos por 48 horas até atingir, aproximadamente, 80% de confluência. Em seguida, o meio de cultura foi substituído pelo meio de indução a diferenciação (DMEM contendo 10% de FBS, 0,5 mM de IBMX, 0,25 μM de dexametasona e 10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina) e, em seguida foi adicionado ao meio a FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 $\mu\text{g/mL}$). Depois de dois dias, o meio indutor foi substituído pelo meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 10 $\mu\text{g/mL}$ de insulina, trocado a cada dois dias. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, fixadas com PFA (paraformaldeído a 10%) e coradas com uma solução contendo Sudan III (0,5 g/100 mL de isopropanol) durante 20 minutos. Após remover a solução de coloração, o corante retido nas células foi diluído com 100 μL isopropanol e a densidade óptica foi medida no comprimento de onda 505 nm (espectrofotômetro Epoch™, Biotek). Os valores médios de densidade óptica obtidos a partir de células expostas a água deionizada foram usados como uma referência de controle (100% de acúmulo de lipídio).

4.7 Modelo *in vitro* de resistência à insulina e avaliação do efeito da FpHEPA na absorção de glicose em adipócitos

Inicialmente, os adipócitos foram lavados com PBS e incubados durante 12 horas com DMEM isento de SBF contendo 0,5% de albumina de soro bovino (BSA, Sigma). Para indução da resistência insulínica, os adipócitos foram expostos à dexametasona (1.0 $\mu\text{mol/L}$) e insulina (10 $\mu\text{g/mL}$) por 96 h (SAKODA et al. 2000; ANDREWS; WALKER 1999; NELSON et al. 2000; YANG et al. 2003). Em seguida, as células cultivadas foram divididas em seis (06) grupos: 1) Controle positivo – cultura de adipócitos normais + insulina (ADN+Ins); 2) controle negativo – cultura de adipócitos com resistência à insulina + insulina (ADRI+Ins); 3) cultura de adipócitos com resistência à insulina + insulina + FpHEPA (25 $\mu\text{g/mL}$) (ADRI+Ins+25); 4) cultura de adipócitos com resistência à insulina + insulina + FpHEPA (50 $\mu\text{g/mL}$) (ADRI+Ins+50); 5) cultura de adipócitos com resistência à insulina + insulina + FpHEPA (75 $\mu\text{g/mL}$) (ADRI+Ins+75) e 6) cultura de adipócitos com resistência à insulina + insulina + FpHEPA (100 $\mu\text{g/mL}$) (ADRI+Ins+100). Em seguida, os sobrenadantes do meio de cultura foram coletados e as concentrações de glicose determinadas pelo teste enzimático-colorimétrico da glicose oxidase utilizando um sistema comercial (Labtest®), seguindo as orientações do fabricante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Epoch™, Biotek) no comprimento de onda 505 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.8 Análise estatística

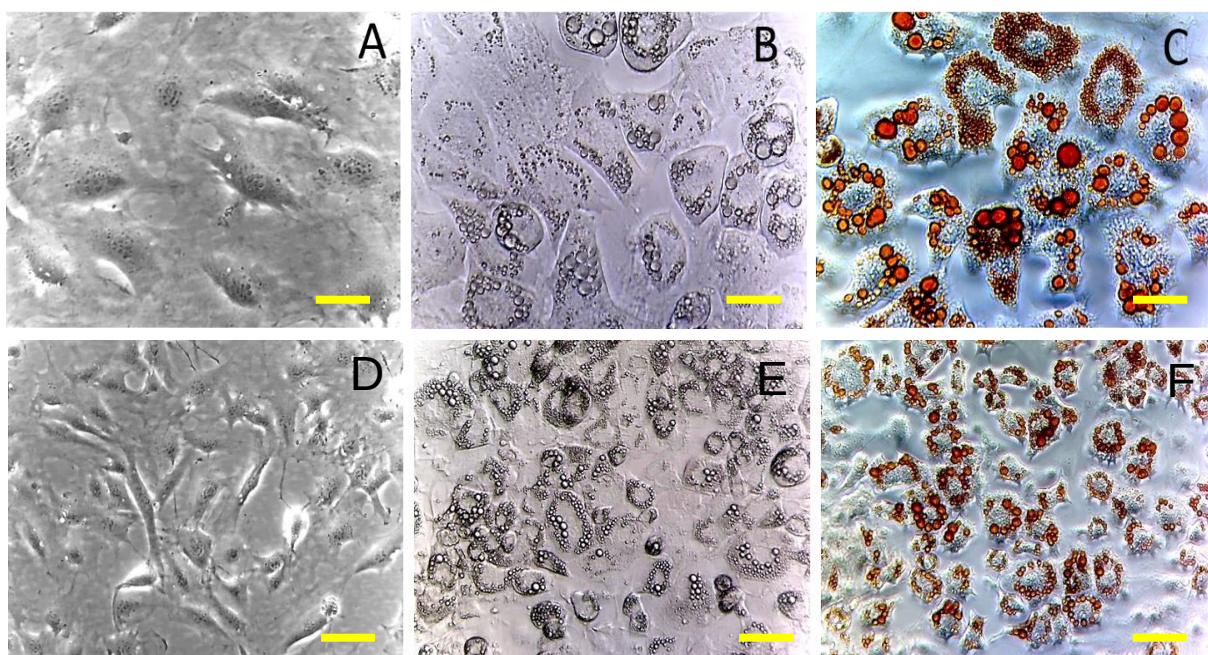
Os resultados foram expressos por média $\pm$ desvio padrão da média e, para fins estatísticos, sendo considerada a significância mínima de 0,05 ($p < 0,05$). Os dados paramétricos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) com aplicação de pós-teste de Turkey. Os dados foram analisados estatisticamente pelo programa Origin (Pro), Version 2016. OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA.

5 RESULTADOS

5.1 Diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos

Conforme pode ser observado na figura 4, os pré-adipócitos 3T3-L1 (células com morfologia fibroblastoide, em forma de fuso – Fig. 4A e D) foram diferenciados em adipócitos (células mais arredondadas que acumulam gotas lipídicas no citoplasma – Fig. 4B e E). Através do corante Sudan III foi evidenciado a ocorrência de diferenciação em mais de 90% dos pré-adipócitos, o que confirma a excelente eficiência da metodologia usada (Fig. 4C e F).

Figura 4 – Fotomicrografia da diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos.

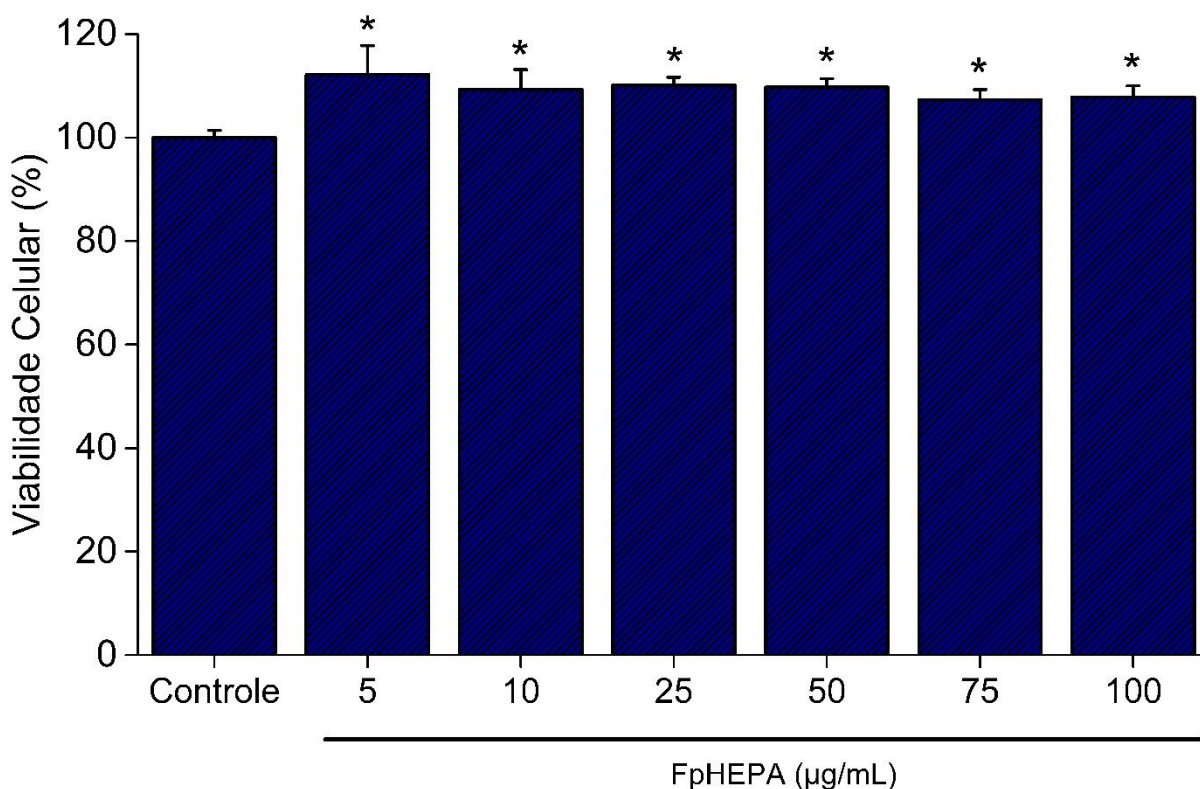


Fonte: Elaborada pelo autor. (A e D) pré-adipócitos 3T3-L1; (B e E) adipócitos diferenciados e (C e F) corados com Sudan III. A, B e C (ampliação de 100×); D, E e F (ampliação de 40×). Barra 75 µm.

5.2 Citotoxicidade da FpHEPA nos adipócitos

Após 96h de incubação dos adipócitos em cultura com FpHEPA (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) não foi registrada nenhuma redução na viabilidade dos adipócitos. Em contraste, todas as concentrações testadas provocaram um aumento discreto ($13\%\pm 5,6$), porém significativo ($p<0,05$) da viabilidade celular quando comparadas ao grupo controle (100% - células incubadas somente com o meio de cultura + água deionizada) (Figura 5).

Figura 5 – Percentual da viabilidade dos adipócitos desafiados com FpHEPA (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 $\mu\text{g/mL}$).

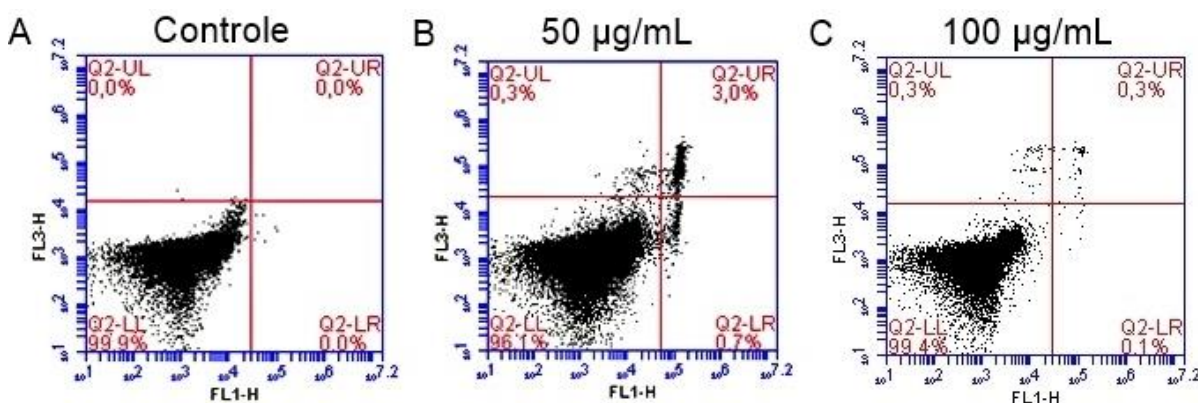


Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados representam experimentos em triplicada para cada concentração testada.

5.3 Análise de necrose e apoptose dos adipócitos

A análise do fluorocitograma (Figura 6), mostra os resultados referentes ao efeito da FpHEPA sobre a apoptose e necrose. Conforme podemos observar, os adipócitos desafiados com FpHEPA (50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram percentuais de morte celular (Fig. 6B e C) ou de necrose consideráveis, quando comparados ao controle (Fig. 6A). O percentual de apoptose nos adipócitos controles ou desafiados com FpHEPA (50 $\mu\text{g/mL}$ ou 100 $\mu\text{g/mL}$) foi 0,0%, 0,3% e 0,3%; enquanto o de necrose foi 0,0%, 0,7% e 0,1, respectivamente.

Figura 6 – Fluorocitograma dos adipócitos desafiados com FpHEPA (50 ou 100 $\mu\text{g/mL}$).

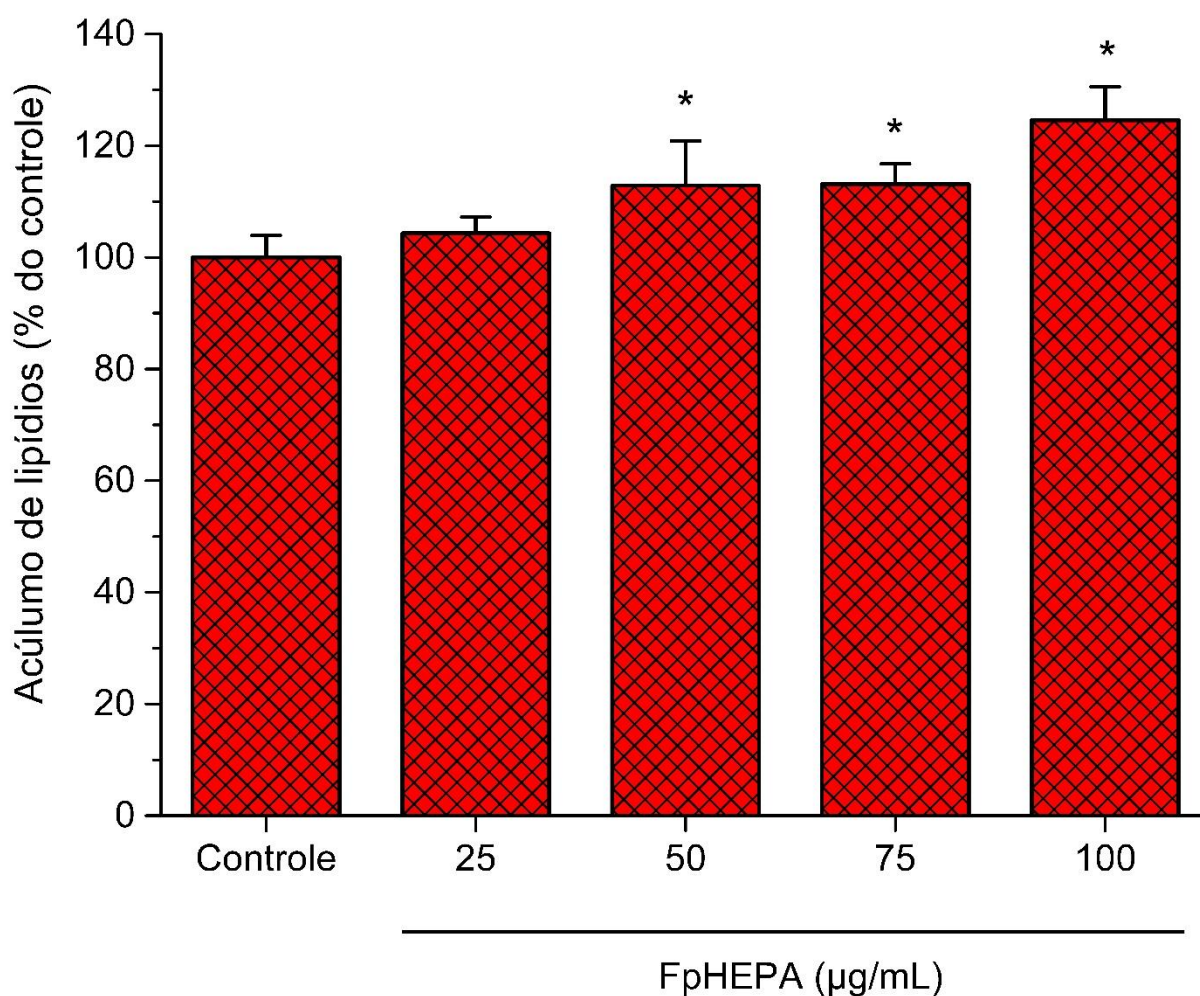


Fonte: Elaborado pelo autor. Eixo Y (população marcada com PI); eixo X (células positivas para marcação com Anexina V/FITC). O quadrante inferior esquerda do fluorocitograma representa as células sem marcação, enquanto a porção inferior direita representa as células em estado de apoptose precoce. A porção superior direita do fluorocitograma mostra as células apoptóticas tardias.

5.4 Efeito da FpHEPA na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos (Adipogênese)

O efeito da FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) sobre a diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos está apresentado na Figura 7. Nenhuma alteração foi observada no processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 desafiados com FpHEPA (25 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, àqueles desafiados com FpHEPA (50, 75 ou 100 $\mu\text{g/mL}$) promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) de gotas lipídicas no citoplasma, indicando um maior grau de diferenciação celular. O aumento no acúmulo de lipídios não foi concentração-dependente.

Figura 7 – Efeito da FpHEPA sobre o acúmulo de gotas lipídicas nos adipócitos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados são expressos como média $\pm$ DP ($n = 9$). * $p < 0,05$, diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.5 Efeito da FpHEPA na absorção de glicose em adipócitos com resistência à insulina

Os adipócitos expostos a dexametasona (1 μ M) exibiram significativa redução na absorção de glicose, demonstrando que o modelo *in vitro* de resistência à insulina foi bem sucedido. A tabela 1 registra o consumo de glicose nos adipócitos com resistência insulínica. Conforme se pode verificar, os adipócitos expostos a FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 μ g/mL) exibiram significativa ($p < 0,05$) aumento no consumo de glicose, quando comparados ao grupo com resistência insulínica sem tratamento (ADR+Ins). O grupo sem resistência insulínica (ADN+Ins) obteve o maior consumo de glicose ($13 \pm 0,3$ mM) e o com resistência insulínica (ADRI+Ins) o menor consumo ($2 \pm 0,16$). Observa-se que os adipócitos expostos a FpHEPA (50 μ g/mL) mostrou o maior aumento do consumo de glicose ($10,4 \pm 0,37$) em comparação com os adipócitos dos grupos, (ADRI+Ins+25, 75 e 100), mas esse aumento não foi concentração-dependente.

Tabela 1 – Efeito da FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 μ g/mL) sobre a absorção de glicose em adipócitos.

Glicose (mM)	
Grupos	
ADN+Ins	$13 \pm 0,3^*$
ADRI+Ins	$2 \pm 0,16$
ADRI+Ins+25	$9,44 \pm 0,31^*$
ADRI+Ins+50	$10,4 \pm 0,37^{* \#}$
ADRI+Ins+75	$8 \pm 0,27^*$
ADRI+Ins+100	$7,6 \pm 0,25^*$

Fonte: Elaborado pelo autor. $*p < 0,05$ em comparação com o grupo ADRI+Ins. $^{\#}p < 0,05$ em comparação com os grupos ADRI+Ins+25, ADRI+Ins+75 e ADRI+Ins+100.

6 DISCUSSÃO

Na incessante busca pela inovação terapêutica, a bioprospecção de plantas medicinais e de seus compostos bioativos é uma estratégia importante na descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. A identificação de novas entidades químicas (NEQ), candidatas a novos fármacos eficazes, com especificidade de alvo e mínimos efeitos colaterais é, sem dúvida, de grande interesse para o tratamento/controle de doenças. Nesse contexto, tem havido muito interesse da comunidade científica na busca de compostos farmacologicamente ativo, derivados de plantas medicinais utilizadas tradicionalmente no controle da síndrome metabólica (resistência insulínica, dislipidemias, DM2).

Parkinsonia aculeata L. (Caesalpiniaceae) é uma planta utilizada empiricamente para controlar as complicações relacionadas ao diabetes e dislipidemias (ALMEIDA 2007). Estudo realizado por LEITE et al. (2011), mostrou que os extrato hidroetanólico ou metanólico de *P. aculeata* reduziu os níveis de glicose no sangue e na urina, e melhorou os parâmetros bioquímicos e fisiológicos relacionados ao metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas em animais diabéticos tipo 1 ou 2. Os resultados anteriormente obtidos em modelos animais (LEITE et al, 2011; ARAÚJO et al., 2016a; ARAÚJO et al., 2016b) reforçam as propriedades antidiabéticas de *P. aculeata*. Porém os mecanismos que medeiam suas propriedades sobre o consumo de glicose, citotoxicidade e adipogênese ainda não foram explorados. Neste estudo, investigamos o efeito *in vitro* da fração polar obtida do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *P. aculeata* (FpHEPA) na citotoxicidade, necrose e apoptose, adipogênese e em modelo de resistência insulínica. Para tal, fizemos uso de uma linhagem celular bem caracterizada, conhecida como pré-adipócito 3T3-L1.

Nossos resultados mostraram que a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos maduros foi bem sucedida, com mais de 90% das células com características fenotípicas (presença de gotas lipídicas, forma globular e aumento do volume celular) de adipócitos maduros. Essa etapa foi decisiva para os ensaios subsequentes (citotoxicidade, necrose e apoptose, adipogênese e absorção de glicose) uma vez que pré-adipócitos apresentam pouco GLUT4 na membrana plasmática. Após a diferenciação em adipócitos, a quantidade de GLUT4 nessas células aumenta devido a translocação dessa proteína para a membrana plasmática após estimulação

com insulina (HUANG et al, 2013). Portanto, o modelo celular utilizado no estudo foi considerado adequado.

Nossos resultados em relação ao potencial citotóxico da FpHEPA (5 µg/mL até 100 µg/mL) não causaram morte celular. Os ensaios de toxicidade (*in vivo* e/ou *in vitro*) são essenciais nas fases iniciais de estudos pré-clínicos para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre os testes *in vitro* para avaliar evidências de citotoxicidade, um dos métodos mais utilizados é o teste de viabilidade celular MTT (tetrazólio sal [brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil-tetrazólio] (MOSMANN, 1983). Em função de sua facilidade de execução e rapidez no fornecimento de resultados, o ensaio do MTT é bastante útil para orientar ensaios não clínicos subsequentes de segurança e eficácia farmacológica.

A linhagem celular 3T3-L1 tem sido amplamente utilizada em ensaios *in vitro* para verificar a citotoxicidade de extratos vegetais (ZHANG et al., 2019; KWAK; KIM, 2019; YUN; PARK; KIM, 2019; MENEZES et al., 2020). Atividade citotóxica da fração aquosa de *P. aculeata* já foi investigada contra as linhagens celulares HepG-2 (carcinoma hepatocelular) e MCF-7 (carcinoma da mama) e não exibiu atividade citotóxica contra essas linhagens (HASSAN; ABDELAZIZ; YOUSEF, 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, os extratos vegetais e os compostos isolados são citotóxicos com valores inferiores de IC₅₀ de 20 µg/mL e 4 µg/mL, respectivamente (BOIK, 2001). Considerando e comparando os valores de referência do Instituto do Câncer com os nossos resultados, observamos que a FpHEPA não apresenta citotoxicidade, frente a adipócitos. O fato de termos utilizado a FpHEPA em adipócitos torna esse trabalho inédito, pois é o primeiro estudo a mostrar os possíveis efeitos citotóxicos de *P. aculeata* em uma linhagem não tumoral.

Neste estudo, a FpHEPA não induziu apoptose nos adipócitos durante o período de 96 horas de exposição. Portanto, os resultados da atividade citotóxica com o teste de MTT corroboram com a análise da aquisição dos dados por citometria de fluxo. A maioria dos fármacos com citotoxicidade alta são capazes de induzir apoptose dentro de 3-24 horas (NORDIN et al, 2017). O percentual de apoptose provocado por um agente tóxico é um critério importante para definir seu potencial citotóxico. A anexina V-FITC é um tipo de corante com alta afinidade para fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática da célula. Durante o evento de apoptose, a membrana plasmática das células torna-se assimétrica e perde sua integridade, resultando na translocação do PS para a membrana plasmática externa (NEGATA, 2018). Essa

condição pode ser detectada com a anexina V-FITC, que é um tipo de proteínas que se liga a fosfolipídios dependentes de cálcio. Como a anexina V é tipicamente usada para eventos de apoptose precoce, usá-la em conjunto com iodeto de propídio (PI) é recomendado para identificação de apoptose precoce e tardia das células. Células mortas são permeáveis ao PI (ABE; MORRELL, 2016). Portanto, a FpHEPA não influenciou em nenhum mecanismo molecular para induzir necrose e/ou apoptose nos adipócitos.

Paralelamente, avaliamos o efeito da FpHEPA na diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos (adipogênese). Os resultados obtidos para acúmulo de lipídios em adipócitos usando coloração com Sudan III indicaram que a FpHEPA não apresenta redução no acúmulo de lipídios nos adipócitos 3T3-L1. Nossos resultados demonstraram um pequeno aumento no acúmulo de lipídios das culturas tratadas nas concentrações de 50, 75 ou 100 µg/mL da FpHEPA. Sabe-se que o Sudan III cora especificamente os triglicerídeos e lipídios neutros. Esta técnica é uma ferramenta valiosa para analisar muitas culturas celulares ou amostras nas quais a diferenciação adipogênica ou acúmulo de lipídios podem ser quantificados (MELO et al, 2017; PARK; KIM, 2020). Segundo SAGBO et al. (2018), quando um agente terapêutico não diminui o acúmulo de lipídios *in vitro* pode não ser um bom agente na redução de perfis lipídicos *in vivo*. Por outro lado, os efeitos benéficos do extrato hidroetanólico de *P. aculeata* particionado com acetato de etila no peso corporal em ratos *wistar* (FRANCO, 2016), da fração aquosa no perfil lipídico sérico (LEITE et al., 2007) e no peso do tecido adiposo branco em camundongos C57BL/6J (ARAUJO et al., 2016) já foram elucidados. Nossos resultados mostraram que a FpHEPA não apresentou efeitos anti-adipogênicos nas células em cultura, pois não diminuiu o acúmulo de triglicerídeos em nenhuma das concentrações testadas. Uma vez que os adipócitos 3T3-L1 são altamente sensíveis à insulina, o aumento do acúmulo de lipídios na presença da FpHEPA sugere uma atividades semelhantes à insulina nessa fração. Resultados semelhantes foram relatados por ALONSO-CASTRO et al. (2008), que a partir da concentração de 50 µg/mL do extrato aquoso de *Guazuma ulmifolia* também houve aumento do acúmulo de lipídios em adipócitos 3T3-L1.

O presente estudo demonstrou que a absorção de glicose reduziu significativamente com a dexametasona e a insulina adicionadas ao meio durante o período de 96 horas, corroborando que o modelo de resistência à insulina *in vitro* foi bem sucedido, conforme descrito na literatura (ZHANG et al., 2012). Os experimentos

realizados com a FpHEPA promoveram o aumento, em todas as concentrações testadas, do consumo de glicose das células nos adipócitos com resistência à insulina. Observa-se uma concentração dependência entre os valores de 25 e 50 µg/mL, porém entre 75 e 100 µg/mL houve diminuição do consumo de glicose quando comparada as demais concentrações. Portanto, não se caracteriza uma relação diretamente proporcional entre concentração e consumo de glicose. Segundo CARMONA et al. (2013) proponentes do uso medicinal de produtos naturais frequentemente afirmam que eles são mais eficazes do que os compostos purificados devido às interações sinérgicas dos metabólitos secundários em sítios de ligação específicos e não específicos. Por outro lado, essa diversidade de substâncias químicas em diferentes concentrações pode atuar de forma antagônica, de acordo com CAESAR et al. (2019). Semelhantemente ao nosso trabalho, EL-HOURI et al. (2014) também observou que em concentrações acima de 70 µg/mL de extratos hidrometanólicos de *Rhodiola rosea* (Crassulaceae) e *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) não exibiu uma relação concentração dependente no aumento da absorção de glicose nos adipócitos 3T3-L1.

De acordo com os resultados de SHI et al. (2019), os adipócitos acumulam lipídios, secretam uma grande variedade de hormônios e citocinas e adquirem mecanismo metabólico para facilitar a captação de glicose em resposta à insulina.

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 tem sido amplamente utilizada para estudar resistência à insulina (ALONSO-CASTRO et al., 2012; TIAN et al., 2016; HASAN et al., 2018), que é uma anormalidade metabólica comum e é uma característica fisiopatológica central da DM2, principalmente dos tecidos periféricos, particularmente no músculo, tecido adiposo e fígado (KAHN et al., 2014). Utilizamos no trabalho a dexametasona para induzir resistência insulínica. Muitos agentes são usados para induzir resistência à insulina *in vitro* em adipócitos 3T3-L1, estes incluem: TNF α , IL-1 e IL-6 (ROTTER; NAGAEV; SMITH, 2003; ALONSO-CASTRO et al., 2012), ácidos graxos livres (EPPS-FUNG et al., 1997; MAZIBUKO-MBEJE et al., 2020), ZHANG et al., 2013), hormônio do crescimento (TAKANO et al., 2001; KIM; PARK, 2017), hipóxia (PRIYANKA et al., 2016), dexametasona (SAKODA et al., 2000). Segundo WANG et al., (2009); ZHANG et al., (2019).

A dexametasona, um glicocorticoide sintético frequentemente prescrito como agente anti-inflamatório e imunossupressor, pode induzir resistência à insulina (TAPPY et al., 1994; SAKODA et al., 2000). O uso excessivo de dexametasona resulta na síndrome de Cushing, caracterizada por obesidade central, resistência à insulina e

outras anormalidades metabólicas. Já é bem conhecido que nos adipócitos tratados com dexametasona diminui em 30% o nível de expressão da proteína GLUT1, o que causa diminuição da captação basal de glicose (SAKODA et al., 2000). Além disso, tratamento com dexametasona não altera a quantidade de proteína GLUT4 dos adipócitos, mas diminuiu a translocação de GLUT4 estimulada pela insulina para a membrana plasmática, o que influencia a diminuição da captação de glicose e diminui significativamente a fosforilação da tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS-1). Portanto, podemos sugerir que a FpHEPA melhora a sinalização da insulina em adipócitos com resistência insulínica *in vitro*.

Na família Fabaceae foi relatado na literatura atividades antidiabéticas em pelo menos 54 espécies vegetais (PERMENDER et al., 2010). Extrato hidrometanólico das folhas e sementes de *Abrus precatorius* L. reduzir os níveis séricos de glicose em ratos induzidos à diabetes por estreptozotocina (REDDY et al., 2010). Flavonoides e ácidos fenólicos de *Cassia auriculata* têm atividade anti-hiperglicêmica em ratos induzidos à diabetes por aloxana e estreptozotocina (NAMBIRAJAN et al., 2018). Algumas outras plantas com atividade antidiabética também têm sido sugeridas para aumentar a captação de glicose em adipócitos 3T3-L1. Um polissacarídeo derivado de *Astragalus membranaceus* melhorou a sensibilidade à insulina ao aumentar a captação de glicose por meio da ativação da AMPK em adipócitos 3T3-L1 (ZHANG et al., 2018). Estudos com extrato aquoso e hidroetanólico de *Psoralea corylifolia* L. têm efeito anti-hiperglicêmico aumentando os níveis de insulina no plasma e diminuindo os níveis de glicose no sangue e colesterol total no plasma em ratos diabéticos tipo 2, além de aumentar a captação de glicose em adipócitos e mioblastos através da translocação do GLUT4 (LEE et al., 2016).

Estudos com espécies vegetais pertencentes a outras famílias botânicas também utilizaram adipócitos para avaliar atividades antidiabéticas *in vitro*. Gorelick et al. (2011) verificaram que o tratamento com extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Chiliadenus iphionoides* (Asteraceae) aumentou a captação de glicose em adipócitos e miócitos *in vitro* a partir da concentração de 50 µg/mL. Extrato semi-purificado das folhas de *Rhinacanthus nasutus* L. (Acanthaceae) não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 5, 10 ou 20 µg/mL e aumentou a captação de glicose em adipócitos (SHAH et al., 2018).

Até o momento, não sabemos com precisão qual ou quais metabólitos secundários são responsáveis pelos efeitos benéficos da *P. aculeata*. Contudo, estudos fitoquímicos da *P. aculeata* revelaram a presença de compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides poli-hidroxilados como: isoorientina, orientina, vitexina, hexosídeo de quercetina, para o qual os efeitos hipoglicemiantes podem ser atribuídos (LIU et al., 2016; HE et al., 2016; HASSAN et al., 2019; ABDELAZIZ et al., 2020).

Os resultados obtidos deste aos ensaios *in vitro* deste trabalho, associados àqueles já existentes utilizando modelos animais (LEITE et al., 2007; LEITE et al., 2011; ARAUJO et al., 2016a; ARAUJO et al., 2016b), poderão contribuir para um melhor entendimento do efeito antidiabético atribuído a *P. aculeata*.

De modo geral, nossos resultados obtidos em modelos *in vitro* mostraram que a FpHEPA aumenta a absorção de glicose em adipócitos resistentes à insulina, sem afetar a viabilidade celular nem o processo de adipogênese, sugerindo sua futura utilidade no controle de distúrbios metabólicos relacionados à DM2.

7 CONCLUSÃO

- A FpHEPA (50, 75 ou 100 µg/ml) induziu um maior grau de diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (adipogênese);
- A FpHEPA (50 ou 100 µg/ml) não induziu morte celular por necrose ou apoptose;
- A FpHEPA (5, 10, 25, 50, 75 ou 100 µg/mL) não apresentou potencial citotóxico em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, nessas mesmas concentrações provocaram um aumento na viabilidade celular;
- A FpHEPA (25, 50, 75 ou 100 µg/mL) reduziu a resistência à insulínica induzida por dexametasona em adipócitos;
- Nossos resultados sugerem que a FpHEPA tem potencial de aplicação em futuras terapias para o controle de distúrbios metabólicos associados à resistência insulínica.

7.1 PERSPECTIVAS

- Realizar a prospecção fitoquímica da FpHEPA;
- Determinar o efeito da FpHEPA e de seus compostos isolados sobre a captação de glicose em outras linhagens celulares (hepatócitos, miócitos) e outros modelos de resistência insulínica *in vitro*;
- Identificar os possíveis alvos moleculares envolvidos no efeito da FpHEPA.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, S.; AL YOUSEF, H. M.; AL-QAHTANI, A. S. Phytochemical profile, antioxidant and cytotoxic potential of *Parkinsonia aculeata* L. growing in Saudi Arabia. **Saudi Pharmaceutical Journal**, vol. 28, no. 9, p. 1129–1137, 2020.
- ABE, J. I.; MORRELL, C. Pyroptosis as a Regulated Form of Necrosis: PI+/Annexin V-/High Caspase 1/Low Caspase 9 Activity in Cells = Pyroptosis? **Circulation Research**, vol. 118, p. 1457–1460, 2016.
- ALI, M. S.; AHMED, F.; PERVEZ, M. K.; *et al.* Parkintin: A new flavanone with epoxy-isopentyl moiety from *Parkinsonia aculeata* Linn. (Caesalpinaceae). **Natural Product Research**, v. 19, p. 53–56, 2005.
- ANDREWS, R.C., WALKER, B.R. Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. **Clinical Science (London)**, v. 96, p. 513–523, 1999.
- ARAÚJO, T. G.; OLIVEIRA, A. G.; VECINA, J. F.; *et al.* Treatment with *Parkinsonia aculeata* combats insulin resistance-induced oxidative stress through the increase in PPAR γ /CuZn-SOD axis expression in diet-induced obesity mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 419, p. 93–101, 2016a.
- ARAÚJO, T. G.; OLIVEIRA, A. G.; VECINA JF, MARIN RM, FRANCO ES, ABDALLA SAAD MJ, DE SOUSA MAIA MB. *Parkinsonia aculeata* (Caesalpinaceae) improves high-fat diet-induced insulin resistance in mice through the enhancement of insulin signaling and mitochondrial biogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 183, p. 95–102, 2016b.
- BAYNEST, H. W. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes & Metabolism**, v. 6, p. 1-9, 2015.
- BENNETT, P. H. Diabetes mortality in the USA: winning the battle but not the war? **The Lancet**, v. 391, p. 2392–2393, 2018.
- BHAGAVANRAJU, M.; AVANAPU, S. R. Antidiabetic activity of the seeds of *Abrus precatorius* in streptozotocin & nicotinamide induced diabetic rats. **Pharmacologyonline**, v. 1, p. 701–705, 2010.
- BILANDA, D. C.; BIDDINGHA, R. G.; DJOMENI DZEUFET, P. D. Antihypertensive and antidiabetic activities of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) stem bark aqueous extract on diabetic hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 246, p. 1–10, 2020.
- BIRD, Stephen R. and HAWLEY, John A. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. **BMJ Open Sport and Exercise Medicine**, vol. 2, no. 1, p. 1–26, 2017.
- BOGAN, J. S. Regulation of glucose transporter translocation in health and diabetes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 507–532, 2012.
- BOLIS, V.; KARADEDOS, C.; CHIOTIS, I. Atypical manifestations of Epstein-Barr virus in children: A diagnostic challenge. **Jornal de Pediatria**, v. 92, p. 113–121, 2016.

BOUCHER, J.; KLEINRIDDER, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014, vol. 6, p. a009191, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) NO BRASIL 2011-2022. M.S 2011.

BURRACK, A. L.; MARTINOV, T.; FIFE, B. T. T cell-mediated beta cell destruction: Autoimmunity and alloimmunity in the context of type 1 diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 1–15, 2017.

CAO, H.; OU, J.; CHEN, L. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 59, no. 20, p. 3371–3379, 2019.

CASTRO, A. V. B.; KOLKA, C. M.; KIM, S. P. *et al.* Obesidade, Resistência à insulina e comorbidades-mecanismos de associação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, p. 600–609, 2014.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C.; DE ANDRADE, S. F.; CECHINEL-FILHO, V. Ethnopharmacological, phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *baubinia forficata*: A mini-review covering the last five years. **Natural Product Communications**, v. 13, p. 911–916, 2018.

CERF, Marlon E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, p. 1–12, 2013.

CERSOSIMO, E.; TRIPLITT, C.; SOLIS-HERRERA, C. *et al.* Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endotex**, p. 1-108, 2018.

CHAD, A.; AL-HASANI, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. **European Journal of Physiology**, v. 472, p. 1273-1298, 2020

CHAUDHURY, A.; DUVOOR, C.; REDDY, D.; VIJAYA, S. *et al.* Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, p. 1-12, 2017.

CHEN, L.; LU, X.; EL-SEEDI, H. *et al.* Recent advances in the development of sesquiterpenoids in the treatment of type 2 diabetes. **Trends in Food Science and Technology**, v. 88, p. 46–56, 2019.

CHENG, J. H.; SUN, Da W.; ZHU, Z. Effects of Frozen Storage Condition Abuse on the Textural and Chemical Properties of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) Fillets. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 477–480, 2017.

CHIANG, J. L.; KIRKMAN, M. S.; LAFFEL, L. M. B. *et al.* Type 1 diabetes through the life span: A position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**, v. 37, p. 2034–2054, 2014.

CORNIER, M. A.; DABELEA, D.; HERNANDEZ, T. L. *et al.* The metabolic syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 29, p. 777–822, 2008.

DEFRONZO, R. A.; FERRANNINI, E.; GROOP, L. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–23, 2015.

DIABETES, Description O F. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, vol. 33, no. SUPPL. 1, 2010.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 122–132, 2010.

ENGLISH, E.; LENTERS-WESTRA, E. HbA1c method performance: The great success story of global standardization. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, p. 408–419, 2018.

FARGION, S.; DONGIOVANNI, P.; GUZZO, A. *et al.* Iron and insulin resistance. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics, Supplement**, vol. 22, p. 61–63, 2005.

FERRARI, F.; BOCK, P. M.; MOTTA, M. T. *et al.* Biochemical and molecular mechanisms of glucose uptake stimulated by physical exercise in insulin resistance state: Role of inflammation. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, p. 1139–1148, 2019.

FONTENELLE, L. C.; FEITOSA, M. M.; MORAIS, J. B. S. *et al.* The role of selenium in insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 54, p. 1–11, 2018.

FOROUHI, N.; G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of diabetes. **Medicine (United Kingdom)**, v. 42, p. 698–702, 2014.

FRANCO, Eryvelton de Souza. **Avaliação do efeito antidiabético de Parkinsonia aculeata L. (Caesalpiniaceae) em ratos wistar com síndrome metabólica: repercurssões bioquímicas e moleculares**. 2016. 97f. Tese (Doutorado acadêmico em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2016.

GALTIER, F. Definition, epidemiology, risk factors. **Diabetes & metabolism**, v. 36, p. 628–651, 2010.

GOOSSENS, G. H.; JOCKEN, J. W. E.; VAN BAAK, M. A. *et al.* Short-term β -adrenergic regulation of leptin, adiponectin and interleukin-6 secretion in vivo in lean and obese subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, p. 1029–1038, 2008.

GOVERS, R. Cellular regulation of glucose uptake by glucose transporter GLUT4. 1. **Ed. Elsevier**, 2014.

HABTAMU WONDIFRAW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes & Metabolism**, vol. 06, no. 05, 2015.

HAMEED, I.; MASOODI, S. R.; MIR, S. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World Journal of Diabetes**, v. 6, p. 598, 2015.

HE, Q.; HUANG, H. Y.; ZHANG, Y. Y.; *et al.* TAZ is downregulated by dexamethasone during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, p. 573–577, 2012.

HONKA, M. J.; LATVA-RASKU, A.; BUCCI, M. *et al.* Insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle, adipose tissue and liver: A positron emission tomography study. **European Journal of Endocrinology**, v. 178, p. 523–531, 2018.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Disease models & mechanisms**, vol. 2, p. 231-237, 2009.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 Glucose Transporter. **Cell Metabolism**, v. 5, p. 237–252, 2007.

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

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

KHARROUBI, A. T. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World Journal of Diabetes**, v. 6, p. 850, 2015.

KIM, SHIN-HYE; PARK, MI-JUNG. Effects of growth hormone on glucose metabolism and insulin resistance in human. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 22, p. 145–152, 2017.

KRALL, L. Resistance. **Keeping the Wild: Against the Domestication of Earth**, v. 5, p. 205–210, 2014.

LEE, H.; LI, H.; NOH, M. *et al.* Bavachin from psoralea corylifolia improves insulin-dependent glucose uptake through insulin signaling and AMPK activation in 3T3-L1 adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016.

LEE, Y.; FLUCKEY, J. D.; CHAKRABORTY, S. *et al.* Hyperglycemia- and hyperinsulinemia-induced insulin resistance causes alterations in cellular bioenergetics and activation of inflammatory signaling in lymphatic muscle. **FASEB Journal**, v. 31, n. 7, p. 2744–2759, 2017.

LEITE, A. C.; ARAÚJO T. G.; CARVALHO, B. M.; MAIA, M. B; LIMA, V. L; Characterization of the antidiabetic role of Parkinsonia aculeata (Caesalpinaceae). **Evidenced-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, p. 1-9, 2011.

LEITE, A. C.; ARAÚJO T. G.; CARVALHO, B. M.; SILVA, N. H.; LIMA, V. L.; MAIA, M. B. S. Parkinsonia aculeata aqueous extract fraction: biochemical studies in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 547-52, 2007.

LE-LE YANG, NA XIAO, JINFENG LIU, KANG LIU, BAOLIN LIUA, PING LI, LIAN-WEN QI. Differential regulation of baicalin and scutellarin on AMPK and Akt in promoting adipose cell glucose disposal. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, p 598–606, 2017.

MARÍN-PENÁLVER, J. J.; MARTÍN-TIMÓN, I.; SEVILLANO-COLLANTES, C. *et al.* Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World Journal of Diabetes**, v. 7, n. 17, p. 354, 2016.

MAZIBUKO-MBEJE, S. E.; ZIQUBU, K.; DLUDLA, P. V. *et al.* Isoorientin ameliorates lipid accumulation by regulating fat browning in palmitate-exposed 3T3-L1 adipocytes. **Metabolism Open**, v. 6, p. 100037, 2020.

MENEZES, T. M.; GAIÃO, W. D. C.; SOUSA LIMA, L. C. A. *et al.* Evaluation of acute oral toxicity, embryotoxicity and cytotoxicity of the polar fraction of Parkinsonia aculeata aerial parts extract. **Toxicology Research**, v. 9, n. 1, p. 19–27, 2020.

MOHAN P., Madan and RAMESH, T. C. Multiple autoimmune syndrome. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 69, n. 4, p. 298–299, 2003.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55–63, 1983.

MUKHERJEE, B.; HOSSAIN, C. M.; MONDAL, L. *et al.* Obesity and insulin resistance: An abridged molecular correlation. **Lipid Insights**, v. 6, p. 1–11, 2013.

NAGATA, S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 489–517, 2018.

NAMBIRAJAN, G.; KARUNANIDHI, K.; GANESAN, Ar. *et al.* Evaluation of antidiabetic activity of bud and flower of Avaram Senna (Cassia auriculata L.) In high fat diet and streptozotocin induced diabetic rats. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1495–1506, 2018.

Nelson, B. A.; Robinson, K. N. A.; Buse, M. G. High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. **Diabetes**, v. 49, p. 981–991, 2000.

OLOKOBA, A. B.; OBATERU, O. A; OLOKOBA, L. B. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. **Oman Medical Journal**, v. 27, n. 4, p. 269–273, 2012.

PERMENDER, R.; HEMA, C.; SUSHILA, R. *et al.* Antidiabetic Potential of Fabaceae Family: An Overview. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, n. 3, p. 161–175, 2010.

PIERO, M. N. Diabetes mellitus – a devastating metabolic disorder. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 40, p. 1–7, 2015.

PINEL, A.; RIGAUDIÈRE, J. P.; JOUVE, C. *et al.* Modulation of insulin resistance and the adipocyte-skeletal muscle cell cross-talk by LCn-3PUFA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 9, 2018.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 156–165, 2008.

PRIYANKA, A.; SINDHU, G.; SHYNI, G. L.; *et al.* Bilobalide abates inflammation, insulin resistance and secretion of angiogenic factors induced by hypoxia in 3T3-L1 adipocytes by controlling NF- κ B and JNK activation. **International Immunopharmacology**, v. 42, p. 209–217, 2017.

RIVERA DIAZ, P. A.; GÓMEZ CAMARGO, Doris E.; ONDO-MÉNDEZ, Alejandro; *et al.* A colorimetric bioassay for quantitation of both basal and insulin-induced glucose consumption in 3T3-L1 adipose cells. **Heliyon**, v. 6, n. 2, 2020.

ROCHA, D. M.; BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. O papel da ingestão dos ácidos graxos da dieta na expressão de genes inflamatórios: Uma revisão crítica. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 2, p. 157–168, 2017.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 1–19, 2018.

ROTTER, V.; NAGAEV, I.; SMITH, U. Interleukin-6 (IL-6) Induces Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes and Is, Like IL-8 and Tumor Necrosis Factor- α , Overexpressed in Human Fat Cells from Insulin-resistant Subjects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 46, p. 45777–45784, 2003

SAKODA, H.; OGIHARA, T.; ANAI, M. *et al.* Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. **Diabetes**, v. 49, n. 10, p. 1700–1708, 2000.

SALEHI, Bahare; ATA, Athar; KUMAR, Nanjangud V. Anil; *et al.* **Antidiabetic potential of medicinal plants and their active components**. [s.l.: s.n.], 2019.

SHARMA, S.; VIG, A. P. Evaluation of in vitro antioxidant properties of methanol and aqueous extracts of Parkinsonia aculeata L. leaves. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

SHARMA, S.; VIG, A. P. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of parkinsonia aculeata linn. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SHARMA, S.; SHARMA, S.; VIG, A. P. Antigenotoxic potential of plant leaf extracts of Parkinsonia aculeata L. using Allium cepa assay. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 130, p. 314–323, 2018.

SHI, J.; FAN, J.; SU, Q. *et al.* Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 1, p. 1–16, 2019.

SHIVAPRASAD, C.; MITTAL, R.; DHARMALINGAM, M. *et al.* Zinc transporter-8 autoantibodies can replace IA-2 autoantibodies as a serological marker for juvenile onset type 1 diabetes in India. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 3, p. 345–349, 2014.

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

SMITH, R. L.; SOETERS, M. R.; WÜST, R. C. I. *et al.* Metabolic flexibility as an adaptation to energy resources and requirements in health and disease. **Endocrine Reviews**, vol. 39, no. 4, p. 489–517, 2018.

Sociedade Brasileira de Diabetes. Conduta Terapêutica no Diabetes Tipo 2 – Algoritmo SBD 2014. **Posicionamento Oficial SBD nº 01/2014**. Acesso em 28 de Outubro de 2020.

STÖCKLI, J.; DAVEY, J. R.; HOHNEN-BEHRENS, C. *et al.* Regulation of glucose transporter 4 translocation by the rab guanosine triphosphatase-activating protein AS160/TBC1D4: Role of phosphorylation and membrane association. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 12, p. 2703–2715, 2008.

TAKANO, A.; HARUTA, T.; IWATA, M. *et al.* Uncoupling Phosphatidylinositol 3-Kinase and Its Downstream Signals in 3T3-L1 Adipocytes. **Diabetes**, v. 50, n. 8, p. 1891–1900, 2001.

TALEVI, A. Multi-target pharmacology: Possibilities and limitations of the “skeleton key approach” from a medicinal chemist perspective. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–7, 2015.

TAN, S. Y.; MEI WONG, J. L.; SIM, Y. J. Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 13, n. 1, p. 364–372, 2019.

TAPPY, L.; RANDIN, D.; VOLLENWEIDER, P. Mechanisms of dexamethasone-induced insulin resistance in healthy humans. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 79, p. 1063–1069, 1994.

TONIOLO, A.; CASSANI, G.; PUGGIONI, A. *et al.* The diabetes pandemic and associated infections: Suggestions for clinical microbiology. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 30, p. 1–17, 2019.

ULRICH-MERZENICH, G.; PANEK, D.; ZEITLER, H. *et al.* Drug development from natural products: Exploiting synergistic effects. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 208–219, 2010.

VAN EPPS-FUNG, M.; WILLIFORD, J.; WELLS, A. Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. **Endocrinology**, v. 138, p. 4338–4345, 1997.

WANG, Y. D.; CUI, K.; ZHAO, H. *et al.* Bushen Ningxin Decoction pharmacological serum promotes the proliferation and suppresses the apoptosis of murine osteoblasts through MAPK pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 221–226, 2009.

WENZLAU, J. M.; HUTTON, J. C. Novel diabetes autoantibodies and prediction of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 13, p. 608–615, 2013.

WU, Y.; DING, Y.; TANAKA, Y. *et al.* Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. **International journal of medical sciences**, v. 11, p. 1185–1200, 2014.

YANG, G. Z.; GAO, X. P.; YAN, J. F.; OU, K. Q.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, J. Molecular mechanism of dexamethasone and insulin induce insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Southwest China Normal University (Natural Science)**, v. 28, p. 460–464, 2003.

YIN, J.; GAO, Z.; LIU, D. Berberine improves glucose metabolism through induction of glycolysis. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 294, p. 148–156, 2008.

YIN, J.; ZHANG, H.; YE, J. Traditional Chinese Medicine in Treatment of Metabolic Syndrome. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 8, p. 99–111, 2008.

YUN, Y. R.; PARK, S. H.; KIM, I. H. Antioxidant effect of Kimchi supplemented with Jeju citrus concentrate and its antiobesity effect on 3T3-L1 adipocytes. **Food Science and Nutrition**, v. 7, p. 2740–2746, 2019.

ZEBISCH, K.; VOIGT, V.; WABITSCH, M. *et al.* Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 425, p. 88–90, 2012.

ZHANG, C. H.; SHENG, J. Q.; SARSAIYA, S. *et al.* The anti-diabetic activities, gut microbiota composition, the anti-inflammatory effects of Scutellaria–coptis herb couple against insulin resistance-model of diabetes involving the toll-like receptor 4 signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 202–214, 2019.

ZHANG, C. H.; XU, G. L.; LIU, Y. H. *et al.* Anti-diabetic activities of Gegen Qinlian Decoction in high-fat diet combined with streptozotocin-induced diabetic rats and in 3T3-L1 adipocytes. **Phytomedicine**, v. 20, p. 221–229, 2013.

ZHANG, C. H.; YU, R. Y.; LIU, Y. H. *et al.* Interaction of baicalin with berberine for glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and HepG2 hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 864–872, 2014.

ZHANG, M.; SUNABA, T.; SUN, Y. *et al.* Anti-inflammatory marine cyclic peptide stylissatin A and its derivatives inhibit differentiation of murine preadipocytes. **Chemical Communications**, v. 55, p. 5471–5474, 2019.

ZHAO, C.; YANG, C.; LIU, B. *et al.* Bioactive compounds from marine macroalgae and their hypoglycemic benefits. **Trends in Food Science and Technology**, v. 72, p. 1–12, 2018.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA TOXICOLOGY RESEARCH – QUALIS A4



Toxicology Research

Toxicology Research, 2020, 1–9

doi: 10.1093/toxres/tfz002
Advance Access Publication Date:
Paper

Downloaded from https://academic.oup.com/toxres/advance-article-abstract/doi/10.1093/toxres/tfz002/5743067 by Universidade Federal de Pernambuco user on 02 March 2020

PAPER

Evaluation of acute oral toxicity, embryotoxicity and cytotoxicity of the polar fraction of *Parkinsonia aculeata* aerial parts extract

Tamires Meira Menezes,¹ Wyndly Daniel Cardoso Gaião,¹
Larissa Caroline de Almeida Sousa Lima,¹ Ana Katarina Bezerra da Silva,¹
Laísa Wanessa Santos Lima,¹ Áurea Marcela de Souza Pereira,¹
Luciano Clemente da Silva,¹ Valdir Luna da Silva,¹
Eryvelton de Souza Franco,² Silvanía Tavares Paz,³ Carina Scanoni Maia,⁴
Tânia Maria Sarmento da Silva,⁵ and Maria Bernadete de Sousa Maia^{1,*}

¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil,

²Department of Veterinary Medicine, Brazilian University Center, Recife, Pernambuco, Brazil, ³Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁴Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, and ⁵Department of Chemistry, Rural Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Correspondence address. Laboratory of Pharmacology of Bioactive Products, Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco, Av. Moraes Rego, s/n, University City, 50670-910 Recife, Pernambuco, Brazil. Tel: +55 85 4009 8060, +55 (81) 992138889; Fax: +55 81 21268976; E-mail: mbsm@ufpe.br

Abstract

Ethnopharmacobotanical information reports that *Parkinsonia aculeata* infusion is used to control diabetes-related complications and dyslipidemia. However, few studies are reported on the safe use of this species. The aim of this study is to evaluate the acute toxicity, embryotoxicity and cytotoxicity of a polar fraction obtained from hydroethanolic extract of *P. aculeata* (PfrHEPA). For the acute toxicity test, we considered the *Up and Down* method which the guidelines are described by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD N°425). The animals were treated with PfrHEPA (2000 mg/kg) or with distilled water (10 ml/kg) by gavage and observed from Day 1 to 14. For embryotoxicity assay, zebrafish embryos were exposed to PfrHEPA (100 mg/L) and toxicity parameters were observed during four consecutive days. The cytotoxicity of PfrHEPA (5, 10, 25, 50, 75 and 100 µg/ml, respectively) was performed on normal cell lines (mesenchymal stem cells, African green monkey renal cells and mouse pre-adipocytes 3 T3-L1 using the MTT salt reduction assay. In the acute toxicity test, no mortality was observed in mice treated with PfrHEPA (2000 mg/kg), as well as behavioral changes, histopathological abnormalities and hematological and biochemical variables. In the embryotoxicity test, no abnormal changes related to the toxicological parameters were observed in the period of 96 h. Regarding the cytotoxicity assay, PfrHEPA showed no cytotoxic effect on the normal cell lines tested, with an IC₅₀ value > 100 µg/ml. These results suggest the safe use of *P. aculeata*, however, more trials are needed for PfrHEPA to be presented as new safe therapeutic proposal for the control of metabolic disorders.

Keywords: *Parkinsonia aculeata*; toxicology; diabetes mellitus

Received: 10 November 2019; accepted: 28 November 2019

© The Author(s) 2020. Published by Oxford University Press. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Introduction

Globally, a wide variety of plant species have been studied or used by folk medicine as alternative or complementary therapy to control metabolic disorders (e.g. diabetes, dyslipidemia and metabolic syndrome). In this context, several authors report the use of plant species, many of which have been used ethnopharmacologically or experimentally, to treat symptoms arising from metabolic disorders [1–12]. Among these species, we highlight *Parkinsonia aculeata* originating from arid, semi-arid and subhumid zones between the southern USA and northern Uruguay [13]. Its occurrence was recorded in the region of Xingó, Northeast Brazil, where it is used by the local community as an antidiabetic plant through infusion and decoction of leaves, twigs and flowers and ingested during the day [14]. However, the empirical and indiscriminate use by traditional communities of substances extracted from plant species may have beneficial effects, inherent to their therapeutic potential, but also side effect due to their toxicity. The phytochemistry of aerial parts of *P. aculeata* has revealed the presence of several compounds (glycosylated tannins, steroids and flavonoids) with pharmacological potential [11] known to improve glucose tolerance [15,16].

P. aculeata has been intensively investigated by our research group on experimental models of diabetes and metabolic syndrome. Initially, our team has demonstrated that the water-soluble fraction of *P. aculeata* hydroethanolic or methanolic extract reduced blood and urine glucose levels and improved biochemical and physiological parameters related to carbohydrate, lipid and protein metabolism in diabetic animals [12]. Certainly, to fully understand the mechanism of new antidiabetic agents, it is important to study the crucial molecules that may be therapeutic targets for the treatment of insulin resistance. Thus, we also demonstrate that administration of ethyl acetate-partitioned hydroethanolic extract from *P. aculeata* (PfrHEPA) improves insulin resistance in obese mice (reduction in fasting blood glucose, insulinemia and leptinemia and in the HOMA-GO [17]). We also observed that treatment with PfrHEPA improves the signaling pathway of insulin in the liver, muscle and adipose tissue of these animals and that this effect involves the increase of mitochondrial biogenesis, proven by activating the AMPK α -PGC1 α axis in obese mice [18]. These evidences, obtained from physiological, biochemical and molecular methods related to PfrHEPA, suggest its therapeutic application to control the deleterious effects of diabetes and metabolic syndrome. Attributable to its therapeutic potential, further studies on its properties and toxicological effects are needed. In this context, the aim of this study is to evaluate the safety of PfrHEPA from toxicity assays: acute toxicity, embryotoxicity and cytotoxicity.

Materials and Methods

Botanical material

The botanical material used in the experiment was *P. aculeata* L. The material was collected in the region of Xingó Nordeste. The plant species was identified (H.P. Bautista (INCRA-BA)) and one specimen was deposited (n° 500) in the Xingó Herbarium (Canindé de São Francisco).

Obtention of hydroethanolic extract of *Parkinsonia aculeata* and its polar fraction

Aerial parts of *P. aculeata* were dehydrated in a forced circulation oven at 50°C and pulverized in a mill. The hydroethanolic extract was obtained by macerating the plant material (100 g) in a

solution composed of ethanol/water (1: 1, v/v) under mechanical stirring for 48 h at 23°C and then filtered on qualitative filter paper. Subsequently, hydroethanolic extract was concentrated in a rotary evaporator and placed in a decanting funnel with ethyl acetate (1:1) to obtain the polar fraction. Then, the obtained polar fraction was evaporated to remove residual solvent and frozen (–20°C) to be subjected to lyophilization process. The obtained material was identified as polar fraction obtained from hydroethanolic extract of *P. aculeata* (PfrHEPA). For the toxicological tests, PfrHEPA was solubilized in distilled water (vehicle) on the day of the experiment.

Acute oral toxicity

The Acute Toxicity Test was performed according to the guidelines established by the Guideline for testing of chemical Organization (OECD). The 'Up and Down' Method Threshold Dose Test (OECD No. 425) was considered, which starts with the highest allowable dose (2000 mg/kg).

Twelve female Swiss Webster mice with 20–25 g body weight from the Aggeu Magalhães Research Center (CPqAM-Fiocruz/PE) were used, following the recommendations of the Animal Research Ethics Committee (CEPA) (Case No. 23076.042375/2016-34). The animals were housed in a polypropylene box, kept in favorable conditions for animal welfare, with light-dark cycle brightness, temperature of 22 ± 2°C, humidity of 50–60% and controlled air circulation. *Ad libitum* drinking water and Presence controlled ration were offered during the 14 days of compliance with pre-established criteria. The animals were randomly divided into two experimental groups and submitted to the respective treatments in a single dose: Control Group (CG), vehicle (water) (n = 6) Treated Group (PfrHEPA); (GT2000) (n = 6). Observing the survival of the first animal within 48 h, the same dose was repeated in five consecutive animals. At the end of experiments, the animals were anesthetized with thiopental (30 mg/kg; i.p.) and blood samples were obtained through the orbital plexus for later determination of hematological variables (Red blood cells, Hemoglobin, Hematocrit, ACV, CMCH, Total leukocytes, Lymphocytes, Monocytes, Eosinophils) and serum level of Glucose, Creatinine, Total cholesterol, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)) and The tests were performed at the Central Laboratory of the Hospital das Clínicas at Federal University of Pernambuco. Then all the animals were euthanized in a CO₂ chamber.

Embryotoxicity

The embryotoxicity test was performed according to OECD guidelines (No. 236). In total, 30 females and 10 adult males of *Danio rerio* fish, wild type, known as 'Zebrafish' or 'Paulistinha', aged 6–8 months, were used to obtain the embryos. The animals were acclimatized for 2 weeks in 20 L glass aquariums with 14:10 light/dark cycle photoperiod and kept at the Laboratory of Comparative Physiology and Animal Behavior of the Department of Physiology and Pharmacology of the Federal University of Pernambuco. The parameters of the aquarium water conditions were controlled: temperature maintained at 27 ± 1°C, pH 7.1 ± 0.5, dissolved oxygen ≥ 95% of saturation. The animals were fed five times a day with commercial feed and brine shrimp.

To reproduce and obtain the embryos, females with bulging belly and males with strong yellowish color were selected in the pectoral fins 24 h before mating. After 24 h of acclimatization, the animals were allocated to glass aquariums

(11.5 cm × 34.5 cm × 15.5 cm) and a ratio of two females to one male for mating. Once spawning was confirmed, the eggs were collected with the aid of a Pasteur pipette and transferred to Petri dishes for the selection of fertilized and viable eggs to ensure the initial validation of the test through the stereomicroscope. Unfertilized eggs that showed irregularities were discarded. After selection, the embryos were transferred to a 24-well microplate, with dilutions and five concentrations determined from the pilot test (100 mg/L) to observe embryonic development at 24, 48, 72 and 96 hpf (hours after fertilization) exposure. The test was started immediately after fertilization to 96 hpf.

The animals were treated daily until 96 hpf, where 20 embryos were exposed to 2 ml of the test solution and four kept in water (internal control) filled with. A microplate was also used for control with all embryos kept in water. Morphological characteristics during embryonic development were computed from the GMS morphological index from different criteria or endpoints. Each change that demonstrates abnormality will result in a lower score, which corresponds to embryo malformation or delayed developmental stage [19]. The tests were performed in authentic triplicate.

Cytotoxicity

For the cytotoxicity test, three cell lines (3 T3-L1, pre-adipocytes of mice; MSC, mesenchymal stem cells; VERO, renal cells of African green monkey (*Cercopithecus aethiops*)) obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil) were used. The cell lines were grown in RPMI 1640 or DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% of antibiotics, and kept in a greenhouse at 37°C and atmosphere containing 5% of CO₂. The cytotoxicity of the PfrHEPA (5, 10, 25, 50, 75 and 100 µg/ml, respectively) was performed using the salt reduction assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)] (Sigma). Cell lines 3T3-L1, CTM and VERO were seeded at 1×10^4 cells/well in a volume of 100 µl in RPMI medium and added in a 96-well microplate, then plated in a 5% CO₂ oven at 37°C. After 72 h, 25 µl of MTT solution was added and the plates incubated for 3 h in the oven. For absorbance reading, a plate spectrophotometer was used at 595 nm after the dissolution of the precipitate. Optical density values determined the concentration of PfrHEPA capable of reducing viable cells by 50%. The cytotoxicity test was performed in duplicate.

Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation. The analysis was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) method, followed by Tukey or two-way test followed by Bonferroni. The significance level of $P \leq 0.05$ (5%) was considered for statistical purposes.

Results

Acute oral toxicity

Clinical and behavioral signs. Table 1 shows the mortality/survival data observed for 14 consecutive days after treatment. PfrHEPA was administered by gastric tube into the first animal and after 48 h survival was verified in animal 1. From this result, five animals were tested consecutively. Since the three consecutive animals survived the threshold dose test (2000 mg/kg), an

Table 1: Registration of mortality in groups of females, Swiss Webster mice treated by gavage with PfrHEPA (2000 mg/kg) to estimate the LD₅₀ According to the GHS (OECD-425)

Nº of animals	Death/survival
1	O
2	O
3	O
4	O
5	O
6	O

O = survived

LD₅₀ > 2000 mg/kg is estimated (Table 1). During the first determined periods (15, 30 and 60 min, respectively) and 24 h after treatment, no physical and behavioral changes were observed in the animals. Animals 1, 2, 3, 4, 5 and 6 showed no signs of acute toxicity for 14 days. Thus, it was not possible to classify acute oral toxicity, since its DL was above 2000 mg/kg.

Weight evolution and Food Consumption. Figures 1 and 2 represent the average food intake and weight evolution of the animals submitted to the 14 days toxicity test. During this period, no statistical differences were observed regarding body weight and feed intake when compared to control during the analysis. Treatment with PfrHEPA was not able to cause physiological changes in the animals during the period.

Biochemical and hematological parameters. Tables 2 and 3 represent the results of the hematological and biochemical assay performed. The analysis of biochemical and hematological parameters revealed no statistically significant differences between the groups.

Macroscopic analysis of organs. As shown in Table 4, no macroscopic changes were observed in the organs analyzed (Heart, Liver, Kidneys, Lung and Stomach) when compared to the Control Group with the Treated Group with PfrHEPA.

Histopathological analysis. In the group treated with PfrHEPA and the Control Group, abnormal alterations in the organs analyzed (Kidneys and Liver) were not revealed on histopathological examination. No statistical differences were observed between the study groups.

Embryotoxicity

D. rerio embryos from the Control Group and the Treated Group showed normal development during the observation period (96 hpf). No statistically significant differences were observed between the groups (Figs 3 and 4). Hatching was not delayed by exposure to PfrHEPA in the groups studied. No morphological deformations were observed at the end of 96 hpf of organisms exposed to PfrHEPA.

Cytotoxicity

The cytotoxicity effects of PfrHEPA were evaluated by the MTT assay. As shown in Figs 5–7, the cell lines tested when compared to the Control Group showed no statistically significant differences in cell viability.

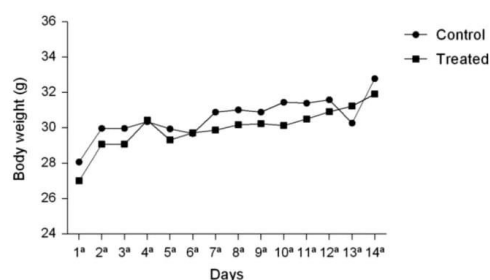


Figure 1: Mean body weight (g) of female Swiss Webster mice ($n = 6$ animals / group) up to the 14th day of observation. Values expressed as mean $\pm$ SD. Significance obtained from the two-way ANOVA test, followed by the Bonferroni test ($P \leq 0.05$).

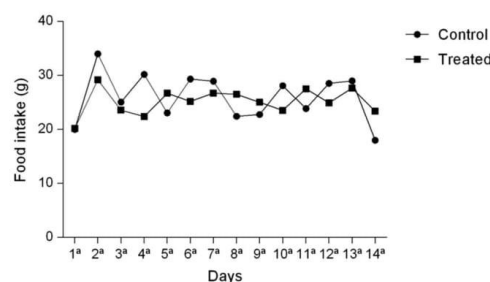


Figure 2: Average food intake (g) of female Swiss Webster mice ($n = 6$ animals / group) up to the 14th day of observation. Values expressed as mean $\pm$ SD. Significance obtained from the two-way ANOVA test, followed by the Bonferroni test ($P \leq 0.05$).

Table 2: Biochemical parameters of female Swiss Webster mice ($n = 6$ animals/group) treated by gavage with vehicle (control, $n = 6$) and with a single dose of PfrHEPA (2000 mg/kg) (treated, $n = 6$)

Parameters	Control	Treated (PfrHEPA)	Reference values*
Glucose (mg/dl)	119.50 $\pm$ 33.11	89.33 $\pm$ 13.27	86.60 $\pm$ 4.00
Creatinine (mg/dl)	0.74 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.13
Total cholesterol (mg/dl)	154.00 $\pm$ 13.94	156.00 $\pm$ 10.56	160.00 $\pm$ 28.90
ALT (IU/L)	35.76 $\pm$ 93.41	38.81 $\pm$ 15.07	36.80 $\pm$ 5.70
Aspartate aminotransferase (IU/L)	44.90 $\pm$ 93.41	45.00 $\pm$ 48.77	40.60 $\pm$ 5.10

Values are presented as mean $\pm$ SD. Significance obtained from the one-way ANOVA test followed by the Tukey test ($P < 0.05$).

* Normal parameters of Joung et al. [20].

Table 3: Hematological parameters of female Swiss Webster mice ($n = 6$ animals/group) treated by gavage with vehicle (control, $n = 6$) and with a single dose of PfrHEPA (2000 mg/kg) (treated, $n = 6$)

Parameters	Control	Treated (PfrHEPA)	Reference values*
Red blood cells ($10^6/\text{mm}^3$)	10.20 $\pm$ 0.85	9.88 $\pm$ 0.41	8.30 $\pm$ 0.60
Hemoglobin (g/dl)	16.30 $\pm$ 0.87	16.40 $\pm$ 0.25	18.5 $\pm$ 1.10
Hematocrit (%)	54.30 $\pm$ 0.50	50.30 $\pm$ 0.48	57.4 $\pm$ 3.70
ACV (fm^3)	49.00 $\pm$ 0.91	50.90 $\pm$ 1.85	69.0 $\pm$ 1.40
CMCH (g/dl)	32.60 $\pm$ 0.91	32.70 $\pm$ 0.56	32.3 $\pm$ 0.40
Total leukocytes ($10^3/\text{mm}^3$)	3.00 $\pm$ 0.12	3.00 $\pm$ 0.92	7.60 $\pm$ 0.70
Lymphocytes	26.60 $\pm$ 1.10	26.70 $\pm$ 9.00	39.2 $\pm$ 7.70
Monocytes	3.60 $\pm$ 0.10	3.30 $\pm$ 0.50	4.50 $\pm$ 0.80
Eosinophils	4.80 $\pm$ 12.08	4.10 $\pm$ 37.50	5.30 $\pm$ 2.90

Values are presented as mean $\pm$ SD. Significance obtained from the one-way ANOVA test followed by the Tukey test ($P < 0.05$).

* Normal parameters of Joung et al. [20].

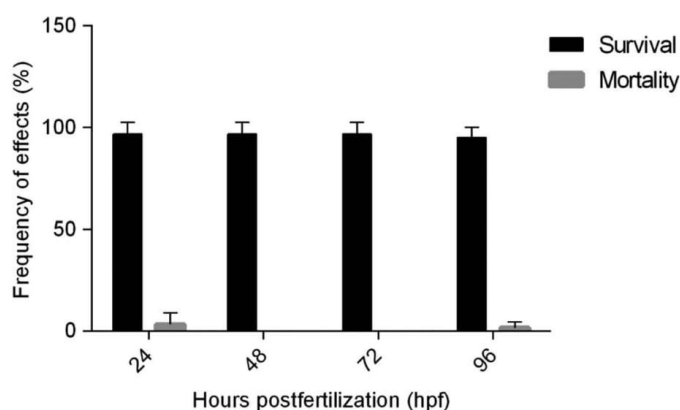


Figure 3: Overview of the frequency of effects of PfrHEPA in early stages of *D. rerio* fish exposed to a vehicle. The mortality/survival ratio is represented by the colors black and gray (black = % survival; gray = % mortality).

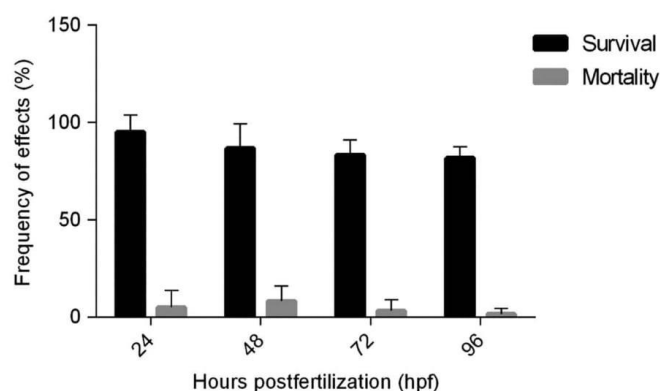


Figure 4: Overview of the frequency of PfrHEPA in early stages of *D. rerio* fish exposed to limit concentration (100mg/kg). The mortality/survival ratio is represented by the colors black and gray (black = % survival; gray = % mortality).

Table 4: Relative organ mass (g) after euthanasia of female Swiss Webster mice ($n = 6$ animals/group) treated via vehicle gavage (control, $n = 6$) and single dose PfrHEPA (2000 mg/kg) (treated, $n = 6$)

Parameters	Control	Treated (PfrHEPA)
Heart	0.48 ± 0.10	0.45 ± 0.05
Liver	4.06 ± 0.49	4.26 ± 0.26
Kidneys	1.33 ± 0.12	1.32 ± 0.13
Lung	0.84 ± 0.20	1.03 ± 0.23
Stomach	1.13 ± 0.08	1.32 ± 0.23

Values are presented as mean $\pm$ SD. Significance obtained from the one-way ANOVA test followed by the Tukey test ($P < 0.05$).

Discussion

P. aculeata is a plant that has in its parts areas bioactive substances that can cause undesirable effects. Scholars report

its pharmacological activity characterized by the hypoglycemic and hypolipidemic potential of the hydroethanolic extract product [11,12]. *P. aculeata* has three C glycosides in their constitution designated as C-glycosylflavone, epi-orientin, saponins, tannins, flavonoids, alkaloids, anthraquinone, glycosides, terpenoids, rotenoids, Parkinsonin-A, Parkinsonia-B and others [21].

The toxicological evaluation of the obtained from the hydroethanolic extract of *P. aculeata* aerial parts was performed to verify the risks at the acute, embryotoxic and cytotoxic levels, as it is widely used empirically by local communities. According to the classification of toxicity, the chemical with LD50 within a range of 5.000 to 15.000 mg/kg is considered non-toxic. In this interval, it suggests that the plant be considered non-toxic in acute ingestion [22]. The results indicated that of *P. aculeata* hydroethanolic extract (PfrHEPA), administered in a single dose, showed low acute toxicity. According to the toxicological classification, *P. aculeata* is classified as Class 5

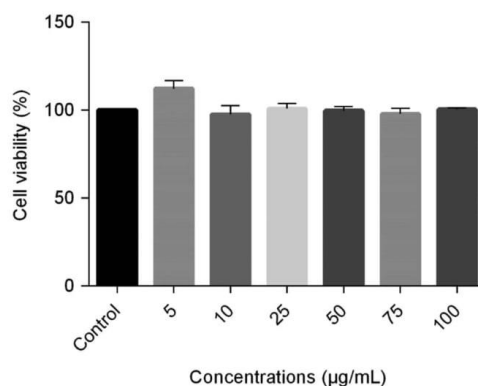


Figure 5: Percentage of growth inhibition of 3T3-L1 cell lines (fibroblasts) exposed to different concentrations of PfrHEPA.

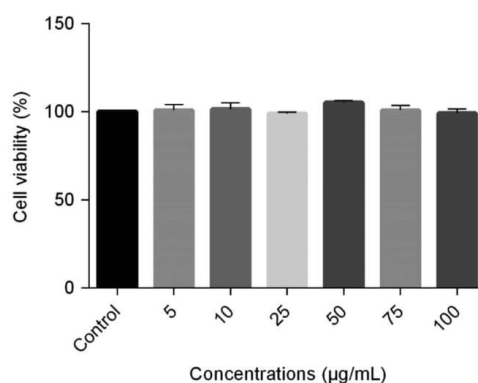


Figure 6: Percentage of growth inhibition of CTM (mesenchymal stem cell) cell exposed to different concentration of PfrHEPA.

(LD50 product > 2000 mg/kg and <5000 mg/kg), being of low toxicity [23].

Several chemical agents can stimulate common mechanisms of toxicity in organs, tissues and cells [24]. The present study aimed to investigate the toxicological effects of the PfrHEPA obtained from the hydroethanolic extract of *P. aculeata* aerial parts in three experimental models. Studies already show the hypolipidemic and hypoglycemic potential of *P. aculeata* and its chemical compounds. However, research related to *P. aculeata* research is still scarce.

Changes in body weight, food and water intake are indicators of adverse drug effects [25, 26]. In the present study, no significant difference was observed in the body weight of Control Group and Treated Group female mice (2000 mg/kg). Thus, the results suggested that treatment with the obtained from the *P. aculeata* hydroethanolic extract did not induce a toxic effect in mice treated with a single dose of 2000 mg/kg. The hematopoietic system is one of the most important index of physiological and pathological status in man and animal. Acute administration of the PfrHEPA was not able to cause significant changes in the

production of leukocytes, lymphocytes, hemoglobin, hematocrit, neutrophils, monocytes, eosinophils and platelets in the PfrHEPA compared to the Control Group after 14 days of observation, indicating that acute administration of the extract is not capable of causing toxic effects on the hematopoietic system.

Regarding the biochemical profile, no statistically significant change was revealed in the measured parameters such as glucose, creatinine, total cholesterol, ALT and AST. These latter markers are used as enzymatic biomarkers in the liver to assess liver toxic effects [25]. Increased serum ALT level can cause hypertrophy and other liver pathologies and liver cell damage if AST level is higher than standard [27].

In this research, no statistical differences were found between ALT and AST levels in female mice of both groups analyzed. After histopathological analysis, no abnormalities in the liver tissue of the control and treated groups were found. According to authors, serum markers considered for detection of loss of renal function are represented by urea, uric acid and creatinine [28]. In the acute toxicity test, no statistical difference in creatinine level was observed when comparing the experimental groups.

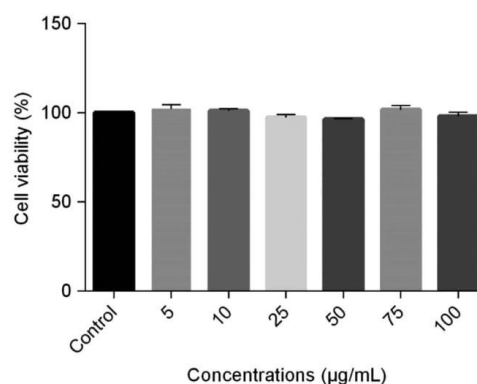


Figure 7: Percentage inhibition of lineage cell growth VERO (renal epithelial cells extracted from an African green monkey) exposed to different concentrations of PfrHEPA.

Concerning glucose serum level, our results corroborate with that reported by Leite [12], who showed that the hydroethanolic of aerial parts of *P. aculeata* had no effect on carbohydrate metabolism in normal (nondiabetic) rats. Organ weight is an important parameter for determining the physiological and pathological state of animals [29]. Scholars suggest after study that after some exposure to potentially toxic substances there will be a slight reduction in body weight gain and organ weight [30].

When comparing the organ weights examined between the groups, no statistical difference was observed in the relative weight of the organs (heart, liver, kidneys, lung and stomach), nor in their macroscopic characteristics, in mice that underwent acute treatment compared to Control Group, suggesting that there were no morphological changes caused by the acute administration of the PfrHEPA.

Toxic changes in organ weight may occur early, before morphological changes. Also, the liver/weight ratio may be predictive for toxicity [31]. In a study conducted in 2018, a high liver-to-body dose-related ratio was observed in women compared with the control, whereas the increase in absolute liver weight was not dose-dependent [32]. The evaluation of toxicity factors of plants of therapeutic interest during embryonic development is important, since several plants derived products that present bioactive compounds are gaining space in the global market, however, without information on their toxicological profile. According to the literature review published [33], zebrafish has currently been an animal model widely used in toxicology trials for chemical toxicity [34], in drug development [35], neurotoxicity [36, 37] and ecotoxicity [38].

As a model organism, zebrafish is a small, economical and easy-to-manage animal, in addition to its particularities during the embryonic phase (*ex vivo* development, body systems formed 72 h after fertilization, translucency) [39], which allows easy exposure makes it a viable model for performing toxicity assays [36]. According to the literature, various compounds such as antibiotics [40], herbicides [41] and natural products [42,43] have had their effects. Toxic substances tested using the zebrafish model. Authors observed a moderate correlation ($R_2 = 0.57$) was

found between embryonic cells and zebrafish when evaluating the effect on azole development [44]. The embryotoxic effect of curcumin methanolic extract (*Curcuma longa*) on zebrafish embryos was studied by a group of researchers, who observed the embryotoxic effect at the highest concentration of 125 µg/ml, with physiological malformation in larval development, dependent on concentration and increasing with increasing exposure [42]. Several scholars have been using the zebrafish model on plant species toxicity. In a study on the toxicity level of ayahuasca in zebrafish embryos, significant abnormalities in the development of zebrafish embryos were found at the highest concentrations. In the present study, the PfrHEPA resulted in low cytotoxic activity in the three strains tested (3 T3-L1, CTM and VERO) demonstrated by cell viability [45]. *P. aculeata* cytotoxicity assay is not yet found in the literature, and this is the pioneer study. Several scholars are currently using mesenchymal cell lines for the cytotoxicity assay [46–48].

The 3 T3-L1 strain has been used in several plant extract cytotoxicity assays [49–51]. *In vitro* tests are applied to check the toxicity of new compounds in the early stages of development, as analysis of the pharmacological and toxicological effects of a product is an essential requirement for its applicability as a therapeutic resource. One of the most commonly used techniques for cytotoxicity assessment is the MTT cell viability test (tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] described in the literature [52].

Recently, researchers have investigated using the mesenchymal stem cell line (MTC) to evaluate the cytotoxicity of the extract of the plant *Cucurbita ficifolia*. Methanol and chloroform extract showed lower cytotoxic potential, while hexane extract showed a high level of cytotoxicity. Specific gravity and solvent density can play a key role in the extraction process of bioactive substances [53].

P. aculeata has three C-glycosides in their constitution designated as C-glycosylflavone, epi-orientin, saponins, tannins, flavonoids, alkaloids, anthraquinone, glycosides, terpenoids, rotenoids, Parkinsonin-A, Parkinsonia-B among others [21]. The methanolic extract of *Astilbe rivularis* L. rhizome, which is rich in terpenoids, flavonoids, tannins, phenols, alkaloids

and saponins in normal and tumor cell lines was studied by researchers in their assays and no signs of cytotoxicity were found in the cells (embryonic kidney (HEK-293) and liver (WRL-68)) [54]. In a study conducted in 2019 with aqueous extracts of *Ochna schweinfurthiana* F. at a concentration of 50 µg/ml were not cytotoxic in the VERO green monkey kidney cell line [23].

Conclusion

The present study can demonstrate that oral administration of PfrHEPA was not capable of causing acute toxicity when given as a single oral dose of 2000 mg/kg, i.e. they had a higher mean lethal dose (LD 50) than 2000 mg/kg and are classified into toxicological Class 5 with low toxicity. There was also no change in body weight and food intake, macroscopic and histological changes in the organs. Regarding embryotoxicity in zebrafish embryos treated with the limit concentration of 100 mg/L, no significant changes were observed such as absence of somites, coagulation, absence of heartbeat and tail detachment during 96 h of observation. No cell-level changes were found in the assay performed on normal cell lines at the five concentrations tested (5, 10, 25, 50, 75, and 100 µg/ml, respectively). In view of the results of this study, further studies using other doses and concentrations are needed to ensure the safe use of PfrHEPA.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgment

This work was supported by Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE-Brazil, Process No. IBPG-1434-2.10/15).

References

- Kar A, Chaudhary BK, Bandyopadhyay NG. Preliminary studies on the inorganic constituents of some indigenous hypoglycemic herbs on oral glucose tolerance test. *J Ethnopharmacol* 1999;**64**:179–84.
- Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003;**84**:105–8.
- Lamba SS, Buch KY, Lewis H, et al. Phytochemicals as potential hypoglycemic agents. *Stud Nat Products Chem* 2000;**21**:457–95.
- Novaes AP, Rossi C, Poffo C, et al. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. *Therapie* 2001;**56**:427–30.
- McCune LM, John T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by indigenous peoples of the north American boreal Forest. *J Ethnopharmacol* 2002;**82**:197–205.
- Said O, Khalil K, Fulder S, et al. Ethnopharmacology survey of medicinal herbs in Israel, the Goan Heights and West Bank region. *J Ethnopharmacol* 2002;**83**:251–65.
- Volpato GT, Damasceno DC, Calderon IMP, et al. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicêmico no controle do diabetes mellitus. *Rev Bras Plantas Med* 2002;**4**:35–45.
- Huo Y, Winters WD, Yao D-L. Prevention of diet-induced type 2 diabetes in the C57BL/6J mouse model by an antidiabetic herbal formula. *Phytother Res* 2003;**17**:48–55.
- Elder C. Ayurveda for diabetes mellitus: A review of the biomedical literature. *Altern Ther Health Med* 2004;**10**:44–50.
- Saxena A, Vikram NK. Role of selected Indian plants in management of type 2 diabetes: A review. *J Altern Complement Med* 2004;**10**:369–78.
- Leite AC, Araújo TG, Carvalho BM, et al. *Parkinsonia aculeata* aqueous extract fraction: Biochemical studies in alloxan induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2007;**111**:547–52.
- Leite AC, Araújo TG, de Melo Carvalho B, et al. Characterization of the antidiabetic role of *Parkinsonia aculeata* (Caesalpiniaceae). *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;**2011**, doi: 10.1155/2011/692378.
- Hawkins JA, Boutaoui N, Cheung KY, et al. Intercontinental dispersal prior to human translocation revealed in a cryptogenic invasive tree. *New Phytol* 2007;**175**:575–87.
- de Almeida CFCBR, de Lima e Silva TC, de Amorim ELC, et al. Life strategy and chemical composition as predictors of the selection of medicinal plants from the caatinga (Northeast Brazil). *J and Arid Environ* 2005;**62**:127–42.
- Cazarolli LH, Zanatta L, Jorge AP, et al. Follow-up studies on glycosylated flavonoids and their complexes with vanadium: Their anti-hyperglycemic potential role in diabetes. *Chem Biol Interact* 2006;**163**:177–91.
- Cazarolli LH, Folador P, Pizzolatti MG, et al. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. *Biochimie* 2009;**91**:843–9.
- Araújo TG, Oliveira AG, Vecina JF, et al. Treatment with *Parkinsonia aculeata* extract combats insulin resistance-induced oxidative stress through the increase on PPAR γ /CuZn-SOD axis expression in diet-induced obesity mice. *Mol Cell Biochem* 2016;**419**:93–101.
- Araújo TG, de Oliveira AG, Vecina JF, et al. *Parkinsonia aculeata* (Caesalpiniaceae) improves high-fat diet-induced insulin resistance in mice through the enhancement of insulin signaling and mitochondrial biogenesis. *J Ethnopharmacol* 2016;**183**:95–102.
- Beekhuijzen M, de Koning C, Flores-Guillén ME, et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. *Reprod Toxicol* 2015;**15**:64–76.
- Joung JY, Lee JS, Cho JH, et al. Acute and repeated toxicological study of Myelophil, an ethanol extract of a mixture of Astragali Radix and Salviae Miltiorrhizae Radix, in beagle dogs. *BMC Complement Altern Med* 2019;**19**:166.
- Besson E, Chopin J, Gunasegaran R, et al. C-glycosylflavones from *Parkinsonia aculeata*. *Phytochemistry* 1980;**19**:2787–8.
- Loomis MD, Hayes AW. *Loomis essentials of toxicology*, 4ed edn. San Diego: Academic Press, 1996, 282.
- Djova SV, Nyegue MA, Messi NA. Phytochemical study of aqueous extract of *Ochna schweinfurthiana* F. Hoffm powder bark and evaluation of their anti-inflammatory, cytotoxic, and Genotoxic properties. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;**2019**. doi: 10.1155/2019/8908343.
- Rubino FM. Toxicity of glutathione-binding metals: A review of targets and mechanisms. *Toxics* 2015;**3**:20–62.
- Mukinda JT, Syce JA. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *J Ethnopharmacol* 2007;**112**:138–44.

26. Mukinda JT, Eagles PF. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. *J Ethnopharmacol* 2010;128:236–40.
27. Han A, Xu H, Kim K. Reference data of the main physiological parameters in control Sprague-dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Lab Anim Res* 2010;26:153.
28. Fuchs TC, Frick K, Emde B, et al. Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials. *Toxicol Pathol* 2012;40:1031–48.
29. Raina P, Chandrasekaran CV, Deepak M, et al. Evaluation of subacute toxicity of methanolic/aqueous preparation of aerial parts of *O. sanctum* in Wistar rats: Clinical, haematological, biochemical and histopathological studies. *J Ethnopharmacol* 2015;174:509–17.
30. Teo S, Stirling D, Thomas S, et al. A 90-day oral gavage toxicity study of dmethylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 2002;179:183–96.
31. Bailey AS, Zidell RH, Perry RW. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: What is the best analytical endpoint? *Toxicol Pathol* 2004;32:448–66.
32. Murbach TS, Glyavits R, Endres JR, et al. A toxicological evaluation of *Chlamydomonas reinhardtii*, a green algae. *Int J Toxicol* 2018;53:62.
33. Horzmann KA, Freeman JL. Making waves: New developments in toxicology with the Zebrafish. *Toxicol Sci* 2018;163:5–12.
34. Rennekamp AJ, Peterson RT. 15 years of zebrafish chemical screening. *Curr Opin Chem Biol* 2015;24:58–70.
35. Gibert Y, Trengove MC, Ward AC. Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. *Curr Med Chem* 2013;20:2458–66.
36. Bailey J, Oliveri A, Levin ED. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013;99:14–23.
37. Nishimura Y, Murakami S, Ashikawa Y, et al. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenit Anom (Kyoto)* 2015;55:1–16.
38. Bambino K, Chu J. Chapter nine – Zebrafish in toxicology and environmental health. In: Sadler KC (ed.). *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 124. 2017, 331–67.
39. Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 1995;203:253–310.
40. Coffey EC, Pasquarella ME, Goody MF, et al. Ethanol exposure causes muscle degeneration in zebrafish. *J Dev Biol* 2018;6.
41. Lanzarin GAB, Félix LM, Santos D, et al. Dose-dependent effects of a glyphosate commercial formulation - roundup® UltraMax - on the early zebrafish embryogenesis. *Chemosphere* 2019;223:514–22.
42. Alafiatayo AA, Lai KS, Syahida A, et al. Phytochemical evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic effects of *Curcuma longa* extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evid Based Complement Alternat Med* 2019;5:3807207.
43. Singulani JL, Pedrosa RS, Ribeiro AB, et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol* 2018;13:1637–46.
44. De Jong E, Barenys M, Hermesen SA, et al. Comparison of the mouse embryonic stem cell test, the rat whole embryo culture and the zebrafish embryotoxicity test as alternative methods for developmental toxicity testing in six 1,2,4 – Triazoles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;253:103–11.
45. Andrade TS, de Oliveira R, da Silva ML, et al. Exposure to ayahuasca induces developmental and behavioral alterations on early life stages of zebrafish. *Chem Biol Interact* 2018;293:133–40.
46. De Simone U, Spinillo A, Caloni F, et al. In vitro evaluation of magnetite nanoparticles in human mesenchymal stem cells: Comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol Mech Methods* 2019;19:1–12.
47. Markmee R, Aungsuchawan S, Pothacharoen P, et al. Effect of ascorbic acid on differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Heliyon* 2019;5:e02018.
48. Omar N, Lokanathan Y, Mohd Razi ZR. The effects of *Centella asiatica* (L.) Urban on neural differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *BMC Complement Altern Med* 2019;19:167.
49. Yun YR, Park SH, Kim IH. Antioxidant effect of Kimchi supplemented with Jeju citrus concentrate and its antiobesity effect on 3T3-L1 adipocytes. *Food Sci Nutr* 2019;7: 2740–6.
50. Kwak SH, Kim YH. Zalusinin C inhibits differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into mature adipocytes. *J Obes Metab Syndr* 2019;28:105–11.
51. Zhang M, Sunaba T, Sun Y, et al. Anti-inflammatory marine cyclic peptide stylissatin A and its derivatives inhibit differentiation of murine preadipocytes. *Chem Commun (Camb)* 2019;55:5471–4.
52. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
53. Aristatle B, Alshammari GM. In vitro biocompatibility and proliferative effects of polar and non-polar extracts of *Cucurbita ficifolia* on human mesenchymal stem cells. *Biomed Pharmacother* 2017;89:215–20.
54. Rai V, Kumar A, Das V, et al. Evaluation of chemical constituents and in vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of rhizome of *Astilbe rivularis* (Bodhookhati), an indigenous medicinal plant from eastern Himalayan region of India. *BMC Complement Altern Med* 2019; 19:200.

ANEXO A – TRABALHO APRESENTADO NO XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FARMACOGNOSIA E XVII SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE FARMACOBOTÂNICA.

